

学校的理想装备

电子图书·学校专集

校园网上的最佳资源

遗传学实验 (第二版)

 BOOK
科学出版社

前言

根据 1977 年 10 月成都综合性大学生物学教材会议的决定，我们在编写“遗传学”教材的同时，又编写了这本“遗传学实验”。目的是为了使学生们更好地掌握遗传学基本理论和有关的研究技术，因而在内容上尽可能配合遗传学的教学。

实验内容包括两个方面：一是验证遗传学的基本规律，例如果蝇的单因子遗传和伴性遗传，链孢霉的分离和交换，细菌的转导，细菌和酵母菌的营养缺陷型（生化突变）的筛选等。二是与遗传学有关的实验技术，这又可分为两类：一类是沿用已久，但目前仍有广泛用处的，如石蜡切片法、压片法、植物的杂交、植物多倍体的诱发等；另一类内容较新，是近一、二十年内发展起来的，但在研究工作上很有用处，如外周血的培养、二倍体细胞培养、植物单倍体培养、鼠伤寒菌微粒体系统的诱变检测法、姊妹染色单体的色差方法等。希望学生们做了这些实验后，既能巩固所学的遗传学知识，又能掌握遗传学研究中的一些实验技术。

本实验指导包括各类实验 21 个，数目较多，而实验时间有限，不可能都做，所以可以根据具体情况，酌情选择。此外还有附录三个，供教师准备实验时参考。至于一些分子水平上的实验技术，限于时间而未收集，有待以后补充。

在编写过程中，承王文华、顾惠娟、吕群、邱信芳、陈佩芬、赵寿元、乔守怡、金建中同志的大力支持，提供实验方法，编写部分实验，除在有关实验后注明外，在此谨表谢意。

刘祖洞 江绍慧
1979.3

再版前言

《遗传学实验》自 1979 年出版以来，已经过五年了。在这五年中，各高等院校已先后开设了遗传学实验课。由于遗传学科的迅速发展和技术的进步，原书已不能满足教学需要。为此，我们重新编写了这本遗传学实验教材，作为第二版供教学使用。

在这次改编中，不仅增加了一些新的实验，而且还在我们自己工作的基础上，对原有的实验内容做了较大的修改和补充。各位老师和同学在使用本教材的过程中，如发现欠妥和不足之处，或应修改和补充的地方，欢迎大家提出宝贵意见。

刘祖洞江绍慧
上海复旦大学生物工程系

一九八五年一月

遗传学实验

实验一 减数分裂

一、实验原理

减数分裂是一种特殊方式的细胞分裂，仅在配子形成过程中发生。这一过程的特点是：连续进行两次核分裂，而染色体只复制一次，结果形成四个核，每个核只含单倍数的染色体，即染色体数减少一半，所以称作减数分裂。另外一个特点是前期特别长，而且变化复杂，包括同源染色体的配对、交换与分离等。

二、实验目的

1. 了解动、植物的生殖细胞的形成过程。
2. 掌握制片方法。

三、实验材料

蚕豆 (*Vicia faba*) 花蕾

短角斑腿蝗 (*Catantops brachycerus*) 精巢

四、实验器具和药品

1. 用具：镊子，解剖针，载玻片，盖玻片，大培养皿，立式染缸，酒精灯，量筒，吸水纸，显微镜。

2. 药品：无水乙醇，冰醋酸，洋红 (carmin)，甘油，松香石蜡。

Carnoy 固定液：无水乙醇 3 份，冰醋酸 1 份。

醋酸洋红：45% 醋酸 100 毫升，加洋红 1 克，煮沸（沸腾时间不超过 30 秒），冷却后过滤即成。也可以再加 1—2% 铁明矾水溶液 5—10 滴，色更暗红。

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。

五、实验说明

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二次连续的细胞分裂（第一次减数分裂和第二次减数分裂）。每一小孢子母细胞产生四个子细胞，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（图 1-1）。

在动物的有性生殖过程中，也有一个由双倍体到单倍体的减数过程。动物的精巢分化出精母细胞，精母细胞减数分裂，形成单倍染色体的精子（图 1-1）。

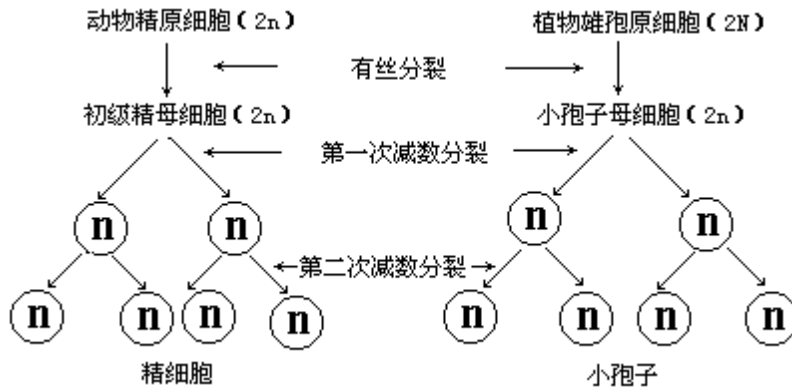


图 1-1 动植物雄性性细胞各时期的对照

在适当的时机采集植物的花蕾或动物的精巢，经固定、染色压片后，就可

以在显微镜下观察到细胞的减数分裂。整个减数分裂可分为下列各个时期。下面图 1-2 至图 1-9 是以雄性雏蝗 (*Chorthippus brunneus*) 的减数分裂各个时期的照片。

第一次减数分裂

前期 细线期 (见图 1-2) : 第一次分裂开始, 染色质浓缩为几条细而长的细线。每一染色体已复制为二个单体, 但在显微镜下还看不出染色体的双重性。

偶线期 (见图 1—3) : 染色体形态与细线期没有多大变化, 同源染色体开始配对。

粗线期 (见图 1-4) : 同源染色体配对完毕, 这种配对的染色体叫双价体, 每个双价体含有四个染色单体, 但仅有两个着丝粒。染色体继续短粗。

双线期 (见图 1-5) : 配对的同源染色体开始分开。

由于染色单体间起过交换, 同源染色体有交叉现象。染色体螺旋化程度加深。

浓缩期: 又叫终变期, 交叉向染色体端部移动, 交叉数减少, 染色体变得更短粗。浓缩期末核膜消失。

中期 各个双价体排列在赤道上, 纺锤体形成, 两个同源

染色体上的着丝粒逐渐远离。双价体开始分离。染色体数仍为 $2n$, 但每一染色体含有两个染色单体 (见图 1-6)。

后期 两条同源染色体分开, 分别移向两极。每一染色体有一着丝粒, 带着两个染色单体。每一极得到 n 条染色体。染色体数已减半 (见图 1-7)。

末期 染色体解旋, 又呈丝状, 核膜形成, 胞质分裂, 成为二个子细胞。

间期在第二次分裂开始以前, 两个子细胞进入间期。但有的植物如延龄草 (*Trillium*) 和大多数动物不经过末期和间期, 直接进入第二次减数分裂的晚前期。

第二次减数分裂

前期 染色体缩短变粗, 染色体开始清晰起来。每个染色体含有一个着丝粒和纵向排列的两条染色单体。前期快结束, 染色体更短粗, 核膜消失。

中期 染色体排列在赤道面上, 每个染色体含一个着丝粒、两条染色单体。两条染色单体开始分离。此时细胞的染色体数为 n , 每一染色体有两条染色单体 (见图 1-8)。

后期 两条染色单体分离, 移向两极, 每极含 n 条染色体 (见图 1-9)。

末期 染色体逐渐解螺旋, 变为细丝状, 核膜重建, 核仁重新形成。胞质分裂, 各成为两个子细胞。

减数分裂结束, 一个细胞经减数分裂形成四个子细胞, 每个子细胞中只有 n 个染色体。因为细胞分裂两次, 染色体只复制一次。

六、实验步骤

(一) 蚕豆花的观察

1. 采集刚现蕾的花序置于固定液内固定三小时后, 换入 70% 的乙醇中。若需保存较久, 可放在 70% 乙醇一份、甘油一份的溶液中。

2. 取已固定好的花序, 按其花蕾大小, 排列在小培养皿中。

3. 剥开花蕾 (先取中等大小的花蕾) 取出花药, 放在载玻片上。

4. 加一滴醋酸洋红在花药上。

5. 加上盖玻片，上面再放吸水纸，用拇指适当加压，把周围的染色液吸干。
6. 用封蜡封片，作成临时标本。
7. 显微镜下观察。

(二) 蝗虫精巢的观察

1. 随蝗虫物种的不同，采集时间有变化。上海地区一般在四月至十月都可采到蝗虫。

2. 采集方法可用手捉或用扫网捕捉。如短角斑腿蝗喜温暖，可在十月左右，在晴天阳光下的草地上用扫网捕捉。

3. 用镊子夹住雄虫尾部，向外拉。可见到一团黄色组织块，这就是蝗虫的精巢。剔除精巢上的其它组织，将其放到 Carnoy 固定液中固定 1.5—2 小时，再放入 70% 酒精溶液中。

4. 将醋酸洋红滴在染色板内，取固定好的精巢放入染液中染色十五分钟以上。

5. 用解剖针从精巢上挑取几条丝状物（精细管）放在载玻片上，加一滴染液，压片。

6. 用封蜡封片，作成临时标本。

7. 显微镜下观察。

(三) 制做永久片

上述压片所得到的片子，只能做临时观察，要长期保存时，可做永久片。步骤如下：

1. 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—3 秒）。

2. 挑取一条已染色的精细管，加一滴染液在载玻片上，加盖玻片，压片。

3. 压片后在酒精灯上烘一下，很快掠过，约 5—6 次。

4. 用封蜡封片。

5. 在显微镜下观察。

6. 如有分裂相多、染色良好的片子也可制作永久标本，方法如下：

皿内置一短玻棒，倒入约 2/3 的固定液。将选好的片子剔除封蜡，翻过来（有材料的面向下），一端搭在玻棒上，在固定液中浸泡。待盖玻片自然脱落后，与载玻片一起轻轻移入以下各缸：

95% 乙醇 $\xrightarrow{1\text{分钟}}$ 无水乙醇 $\xrightarrow{1\text{分钟}}$ 无水乙醇

加 Eupral 一滴，封片。贴上标签。

七、实验结果

绘制观察到的染色体图，同时也可拍摄显微照片。

实验二果蝇唾腺染色体

一、实验原理

双翅类昆虫（摇蚊、果蝇等）幼虫期的唾腺细胞很大，其中的染色体称为唾腺染色体（salivary chromosome）。这种染色体比普通染色体大得多，宽约 $5\ \mu\text{m}$ ，长约 $400\ \mu\text{m}$ ，相当于普通染色体的 100—150 倍，因而又称为巨大染色体。唾腺染色体经过多次复制而并不分开，大约有 1000—4000 根染色体丝的拷贝，所以又称多线染色体（polytene chromosome）。多线染色体经染色后，出现深浅不同、密疏各别的横纹，这些横纹的数目和位置往往是恒定的，代表着果蝇等昆虫的种的特征。如染色体有缺失、重复、倒位、易位等，很容易在唾腺染色体上识别出来。

二、实验目的

1. 练习取出果蝇等幼虫唾腺的技术和制作唾腺染色体标本的方法。
2. 观察多线染色体的特征：a. 巨大；b. 体细胞配对，所以染色体只有半数（ n ）；c. 各染色体的异染色质多的着丝粒部分互相靠拢形成染色中心（chromocenter）；d. 横纹有深浅、疏密的不同，各自对应排列，这意味着基因的排列。
3. 把观察到的好图像画下来。

三、实验材料

黑腹果蝇的三龄幼虫。这种材料既易饲养，又易取得唾腺，但为了得到更好的染色体标本，需要在 20—25 和营养良好的条件下饲养幼虫。选择行动迟缓、肥大，爬上管壁的三龄幼虫（就要化蛹了）做标本最佳。

四、实验器具和药品

1. 用具：双筒解剖镜，显微镜，镊子，解剖针，载玻片，盖玻片，滤纸，绘图纸，煤气灯。

2. 药品：1%的醋酸洋红：称 1 克洋红，溶解于浓度为 45% 的 100 毫升醋酸溶液中煮沸，冷却后过滤使用。

Ephrussi-Beaullé 生理盐水：称取 NaCl 7. 克、 KCl 0.35 克、 CaCl_2 0.21 克溶解于 1000 毫升蒸馏水中（注意：要等先加入的药品充分溶解后再加下一种药品。尤其是 CaCl_2 ，如在其他药品没有充分溶解时加入，会产生沉淀！）。

松香石蜡（balsam paraffin）：用等量的松香和 52 石蜡，放在蒸发皿内用小火煮（大火要烧起来！），待两者充分混和成浓的米黄色，取下来冷却凝固。使用时，用烧热铁丝的前端沾有少量的溶解物，封在载玻片周围。

五、实验步骤

1. 把载玻片置于双筒镜下。载玻片上滴加生理盐水一滴，取三龄幼虫放在其中，操作者两手各握一枚解剖针，左手的解剖针压住幼虫后端 $1/3$ 处，固定幼虫。右手的解剖针按住幼虫头部，用力向右拉，把头部从身体拉开，唾腺随之而出，唾腺是一对透明的棒状腺体（图 2-1）。

2. 在载玻片上除去幼虫其他组织部分，还要把唾腺周围的白色脂肪剥离干净，再把唾腺移到干净的、预先准备的滴有醋酸洋红的载玻片上。

3. 固定染色 10 分钟后，盖上干净的盖玻片，用滤纸先轻轻压一下，吸去多余的染液。然后放在平的桌子上，用大拇指用力压住，并横向揉几次（注意：不要使盖玻片移动，用力和揉动是一个方向，不能来回揉！），用力和揉动方向可因人而异，多做几次，可得较好的片子。

4.用松香石蜡封片，制成临时标本。

5.制成的片子在显微镜下观察。如得到的片子完整良好，而且没有气泡，可在冰箱中保持数日。也可以制成永久片，步骤如下：先剔除封蜡，放入固定液（冰醋酸 酒精=1 3）中，待盖玻片脱落后，再把有材料的载玻片和盖玻片通过下列顺序：95%酒精 1 分钟，纯酒精 1 分钟，再经纯酒精 1 分钟，取出载玻片，加一小滴优巴拉尔（euparal），再取出盖玻片盖上，即可。也可以在纯酒精脱水后，再经过几次不同比例的酒精和二甲苯混合液（3 1 2 1；1 1 1 等），最后到纯二甲苯，取出后用加拿大树胶封片。但这种方法步骤较多，材料容易丢失。

六、观察标本

1.先用低倍物镜观察片子，找到好的染色体图像后，放到视野中心，再用高倍镜观察。

2.黑腹果蝇的唾腺染色体是 $2n=2 \times 4=8$ （图 2-2），但因体细胞配对，又因短小的第 4 染色体和 X 染色体的着丝粒在端部，所以染色体的一端在染色中心上，看上去，各自只形成一条线状和点状染色体。只有第 2 和第 3 染色体的着丝粒在中央，它们从染色中心以 V 字形向外伸出（2L, 2R, 3L, 3R），因此共有 6 条（图 2-3）。

在显微镜下，短小的第 4 染色体有时不易观察到，所以最容易识别的是第 5 条（图 2-4）。

雄果蝇的 Y 染色体几乎包含在染色中心里，因为是异染色质，看起来染色可能淡些。有经验的人可以发现雄果蝇的 X 染色体比雌果蝇 X 染色体要细些，因为雄性只有一条 X 染色体。

3.唾腺染色体上的横纹宽窄、浓淡是一定的，但在果蝇的特定发育时期，它们会出现不连续的膨胀，这称为疏松区（puff），目前人们认为这是这部分基因被激活的标志。

论比。实得比数符合理论比数的程度如何，需要进行 χ^2 测验。

六、实验步骤

1. 选野生型和残翅果蝇为亲本，做正交和反交组合。雌蝇一定要选处女蝇。处女蝇在实验前 2—3 天陆续收集，数目多少根据需要而定。

2. 把长翅果蝇和残翅果蝇进行杂交，正交与反交各一瓶。即：长翅（ ）
× 残翅（ ）；长翅（ ）× 残翅（ ）。（1）把长翅处女蝇倒出麻醉，挑出 5—6 只移到杂交瓶中。（2）其次把残翅倒出麻醉，在放大镜下，白瓷板上仔细挑出 5—6 只雄蝇，移到上述杂交瓶中。

（3）贴好标签：

（正交）			
P: +/+	×	vg/vg	
（♀）		（♂）	
月		日	
姓名			

杂交瓶放到 23 温箱中培养。

反交与正交方法一样。

3. 7—8 天后，倒去亲本果蝇。

4. 再过 4—5 天， F_1 成蝇出现，观察 F_1 翅膀，连续检查 2—3 天。

5. 麻醉 F_1 成蝇，移出 5—6 对果蝇，放到另一培养瓶

内。这里雌蝇无须处女蝇，在 23 温箱中培养（反交同样做一瓶）。

6. 7—8 天后，移去 F_1 亲本。

7. 再过 4—5 天， F_2 成蝇出现，开始观察。连续统计 7—8 天。被统计过的果蝇放到死蝇盛留器中。

七、实验结果

填写下列表格

F_1				
观察结果 统计日期	长翅♀ × 残翅♂		残翅♀ × 长翅♂	
	长翅数	残翅数	长翅数	残翅数
合 计				

F_2				
观察结果 统计日期	长翅♀ × 残翅♂		残翅♀ × 长翅♂	
	长翅数	残翅数	长翅数	残翅数
合 计				

χ^2 测验

	长翅(+) (正交、反交合并)	残翅(vg) (正交、反交合并)	合 计
实验观察数(O)			
预期(3:1)(C)			
偏差(O-C)			
$\frac{(O-C)^2}{C}$			

自由度=n-1=

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-C)^2}{C} =$$

查 χ^2 表

实验四果蝇的伴性遗传

一、实验原理

位于性染色体上的基因，其传递方式与位于常染色体上的基因不同，它的传递方式与雌雄性别有关，因此称为伴性遗传 (sex-linked inheritance)。

果蝇的性染色体有 X 和 Y 两种，雌蝇为 XX，是同配性别；雄蝇为 XY，是异配性别。

二、实验目的

1. 记录交配结果和掌握统计处理方法
2. 正确认识伴性遗传的正、反交的差别

三、实验材料

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 品系

野生型 (红眼), wildtype (+)

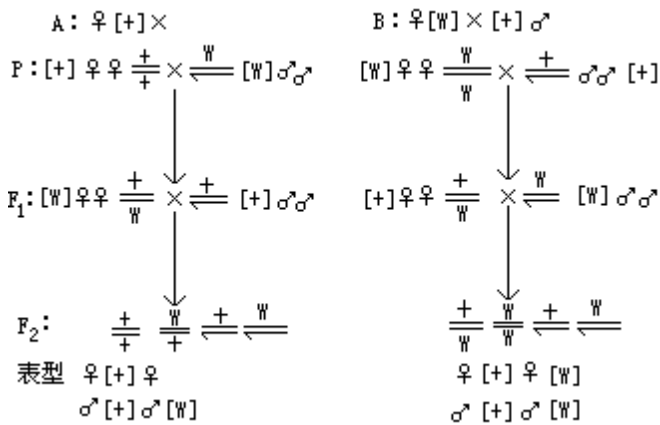
突变型 (白眼), whiteeye (w), 此基因在 X 染色体上

四、实验器具和药品

双筒解剖镜, 大指管, 麻醉瓶, 磁板, 海绵板, 解剖针, 毛笔, 镊子。
红糖, 麸皮, 琼脂, 干酵母等。

五、实验说明

1. 交配方式:



若 A 为正交, F₁ 代、F₂ 代都为野生型 [+], F₁ 相互交配得 F₂ 代, 则都是野生型 [+], 性则野生型 [+] 和白眼 [w] 涓髡家话耄壤 *1 1。

B 是 A 的反交, F₁ 代与 A 不同, 为野生型 [+], 而 湮 0 籽 郟 踳], 此现象又称为绞花式遗传 (Iriss-cross inheritance)。F₁ 相互交配得 F₂ 代, 的红眼与白眼比例为 1 1, 的红眼与白眼比例也是 1 1。

注意:

1. 常染色体性状遗传的正、反交所得子代、性状相同, 而伴性遗传则有不同。

2. 在进行伴性遗传实验时, 也有例外个体产生, 这是由于两条 X 不分离造成的 (B 杂交组合), F₁ 中出现了不应该出现的 性白眼, 但这种情况极为罕见, 约几千个体中有一个。

3. 不分离现象见图 4-1。

六、实验步骤

1. 收集处女蝇：由于雌蝇生殖器官中有贮精囊，一次交配可保留大量精子，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。由于孵化出的幼蝇在 12 小时内（更可靠是 8 小时）不交尾，因此必须在这段时间内把 雌、雄蝇分开培养，所得的 雌蝇即为处女蝇。

2. 准备好培养基，按正、反交组合，把已麻醉的红眼、白眼和红眼、白眼 分别放入不同瓶内进行杂交，贴上标签。标签形式如下：

A组合 $++ \times wY$ 日期 姓名	B组合 $ww \times +Y$ 日期 姓名
-----------------------------------	-----------------------------------

6—7 天后，见到有 F_1 幼虫出现，即除去亲本果蝇（一定要除干净！）

4. 再过 3—4 天，观察 F_1 成蝇的性状。（正、反交有什么不同？眼色和性别的关系如何？）

5. 所出现的 F_1 雌、雄果蝇麻醉后，挑 3—5 对果蝇换入新的培养基继续饲养（此处无需处女蝇，为什么？）。两组合后代不能混合，应分别培养。

6. 6—7 天后又需除干净 F_1 代亲本果蝇。

7. 再过 3—4 天， F_2 代成蝇出现，麻醉后倒在白瓷板上观察眼色和性别，进行统计。

8. 每隔 1—2 天统计一次，累积 6—7 天数据。

七、实验结果统计

A 组合：（正交） $++ \times wY$

F_1	观察结果	各类果蝇的数目	
	统计日期	红眼♀ [+]	红眼♂ [+]

B 组合：（反交） $ww \times +Y$

F_1	观察结果	各类果蝇的数目	
	统计日期	红眼♀ [+]	红眼♂ [+]

A 组合：

F_2

观察结果 统计日期	各类果蝇数目			
	♂红眼[+]	♂白眼[w]	♀红眼[+]	♀白眼[w]
合计				
百分比				

B 组合：

F₂

观察结果 统计日期	各类果蝇数目			
	♂红眼[+]	♂白眼[w]	♀红眼[+]	♀白眼[w]
合计				
百分比				

x²测定：

$$x^2 = \sum \frac{(\text{观察值} - \text{理论值})^2}{\text{理论值}}$$

根据 x²测定，查 x²表，若 P > 5%，说明观察值与理论值之间的偏差是没有意义的，也就是说，可以认为观察值是符合假设的。具体对这个实验来说，所得到的实验结果应该是符合伴性遗传的假设，也就是说眼色的这对性状是由于位于性染色体上 X 上的一对等位基因控制的。

实验五果蝇的二对因子的自由组合

一、实验原理

位于非同源染色体上的两对基因，它们所决定的两对相对性状在杂种第二代是自由组合的。因为根据孟德尔第二定律，一对基因的分离与另一对（或另几对）基因的分离是独立的，所以一对基因所决定的性状在杂种第二代是 3 : 1 之比，而两对不相互连锁的基因所决定的性状，在杂种第二代就呈 9 : 3 : 3 : 1 之比。

二、实验目的

1. 了解两对基因的杂交方法
2. 记录交配结果和掌握统计处理方法
3. 正确认识二对基因自由组合的原理

三、实验材料

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的突变品系

黑檀体突变型, ebony (e) 位于第三染色体

残翅突变型, vestigial (vg) 位于第二染色体

四、实验器具和药品

双筒解剖镜, 大指管, 麻醉瓶, 磁板, 海绵板, 解剖针, 毛笔, 镊子。

红糖, 麸皮, 琼脂, 干酵母等。

五、实验说明

1. 性状特征：黑檀体果蝇 (e) 的体色乌黑，与黑体 (b) 相似，但是它们是不同的染色体上基因所决定。与 (e) 相对应的野生型性状是灰体。(e) 的座位是第 3 染色体 70.7。残翅果蝇 (vg) 的双翅几乎没有，只有少量残痕，与 (vg) 相对应的野生型是长翅。(vg) 的座位是第二染色体 67.0。

2. 交配方式：由于 (e) 和 (vg) 是在不同对的染色体上，两对因子杂种在形成生殖细胞时会产生四种不同类型配子，比例为 1 : 1 : 1 : 1，如子一代个体相互交配，则通过配子相互结合，在子二代可得到 16 种组合，其中 9 种灰长，3 种黑长，3 种灰残，1 种黑残。如下图所示：

$$\begin{array}{c} P: \text{♀} \frac{+}{+} \frac{+}{e} \times \frac{vg}{vg} \frac{+}{+} \text{♂} \\ \frac{+}{+} \frac{e}{e} \quad \frac{vg}{vg} \quad \frac{+}{+} \\ \text{黑檀体} \quad \downarrow \quad \text{残翅} \\ F_1 \quad \frac{+}{vg} \frac{+}{e} \text{ 野生型} \\ \downarrow \text{♀♂ 相互杂交} \end{array}$$

整理后：

1++++, 2+e++, 2+++vg, 4+e+vg, 共 9 种 [+] [+]

1++vgvg, 2+evgvg, 共 3 种 [+] [vg]

1ee++, 2ee+vg, 共 3 种 [e] [+]

1eevgvg, 共 1 [e] [vg]

所以表型比例是 9 : 3 : 3 : 1。

若用反交：即 vgvg++ × ++ee 其结果应该与前面

正交相同（读者可以练习一下），但因残翅果蝇不能飞，只能爬行，所以作雌体亲本比较好，若作雄亲本，得到的子代将减少很多，因而在本例中反交比正交好。

六、实验步骤

1. 收集雌果蝇品系的处女蝇。

2. 准备好培养基，把已麻醉的残翅、果蝇和黑檀体、果蝇，按正、反交方式，分别放入不同培养瓶内，进行杂交，贴好标签，标签形式如下：

$vgvg^{++} \times tee$ ♀ ♂ 日期 姓名	$tee \times vgvg^{++}$ ♀ ♂ 日期 姓名
--	--

3. 6—7 天后，见到有 F_1 幼虫出现，可除去亲本（除干净！）。

4. 再过 3 - 4 天，检查 F_1 成蝇的性状，应该是灰体、长翅（正、反交相同）。若性状不符，表明实验有差错，不能再进行下去。发生差错的原因可能是亲本雌果蝇不是处女蝇； F_1 幼虫出现后亲本未倒干净；杂交时雄蝇选择有误；以及亲本原种不纯等等。

5. 按原来的正、反交各选 5—6 对 F_1 成蝇（ 、 ），换新的培养瓶，继续饲养（此时不需要处女蝇）。

6. 6—7 天后，除去 F_1 代亲本。

7. 再过 3—4 天， F_2 代成蝇出现，麻醉后（可以深度麻醉）倒在白瓷板上，进行统计，每隔两天统计一次，连续统计 6—7 天（当 F_3 出现就失去意义了）。

七、实验结果

F_2 （正、反交合瓶统计）果蝇数目：

子代类型 统计日期	长灰	长黑	残灰	残黑
合计				

用 χ^2 方法测验观察数与理论数符合程度（好适度）。

χ^2 测验：

	长灰	长黑	残灰	残黑	合计
实验观察数 (O)					
理论数 (9:3:3:1) (C)					
偏差 (O-C)					
$\frac{(O-C)^2}{C}$					

$$\chi^2_{[3]} = \frac{(O-C)^2}{C} = ? \text{自由度} = 4 - 1 = 3$$

若 $P > 0.05$ ，说明实验符合二对因子自由组合的假说。

若 $P < 0.05$ ，说明这个实验数据不能用二对因子的自由组合来解释，也就是否定了原来的假设，即不能认为是自由组合。

实验六基因的连锁与交换

一、实验原理

同一条染色体上的遗传因子（基因）是连锁的，而同源染色体基因之间可以发生一定频度的交换，因此在子代中将发现一定频度的重组型，但一般比亲组型少得多。遗传学上以重组百分比作为这两基因之间的距离（除掉%）。重组高说明二基因相距远，重组低说明二基因相距近。但需要指出的是雄性果蝇没有交换，因此只能用雌果蝇的重组值作为某二基因的距离。

二、实验目的

1. 理解连锁和交换的原理
2. 学习实验结果的数据处理和重组值求法

三、实验材料

黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）的品系
 野生型（灰体、长翅），wildtype [++]
 双突变型（黑体、残翅），doublemutant [bvg]

四、实验器具和药品

实验工具和药品见实验四（果蝇的伴性遗传）。
 培养基以及配方见附录一（果蝇的饲养）。

五、实验说明

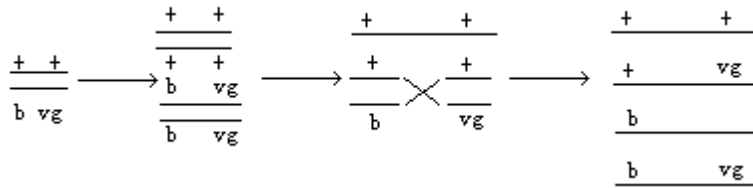
1. 性状特征：双突变型果蝇黑体残翅（bvg），无论雌、雄它们的体色比正常野生型黑得多，翅膀几乎没有，只有少量的残痕，因而不能飞，只能爬行。基因都在第二染色体上，（b）的座位是 48.5，（vg）的座位是 67.0。正常的野生型的相对性状是灰体长翅。

2. 交配方式：

a. 若用纯合野生型 ++/++ 为 ♀，纯合双突变型 bvg/bvg 为 ♂ 进行杂交， F_1 的双杂合体是 ++/bvg（相引相），表型是野生型。取 F_1 的 ♀ 性个体与双突变型 ♂ 回交，得到许多 F_2 子代，其中很多个体都是与原来的亲本相同（即灰体长翅和黑体残翅）称为亲组合（parental combination），同时也出现了少量的与亲本不同的个体（即黑体长翅和灰体残翅）称为重组组合（recombination）。这些重组类型就是 b-vg 间发生交换的结果，如下图所示：

$$\begin{array}{l}
 P: \text{♀} \frac{++}{++} \times \frac{bvg}{bvg} \text{♂} \\
 \quad \text{(灰、长)} \downarrow \text{(黑、残)} \\
 F_2 \text{♀} \frac{++}{bvg} \times \frac{bvg}{bvg} \text{♂} \\
 \quad \quad \quad \downarrow \text{测交}
 \end{array}$$

F_1 的 ♀ 蝇中有些细胞如果出现基因重组，可产生四种配子：



所以某些 F_1 蝇可形成四种配子，但 F_1 蝇连锁完全，只产生一种配子，从而 F_2 为：

♂	♀	<u>+ +</u>	<u>+ vg</u>	<u>b +</u>	<u>b vg</u>
	<u>b vg</u>	<u>+ +</u> <u>b vg</u>	<u>+ vg</u> <u>b vg</u>	<u>b +</u> <u>b vg</u>	<u>b vg</u> <u>b vg</u>

F2 表型 灰、长 灰、残 黑、长 黑、残
数 目 536 112 120 515

这样便可以计算重组值，只要统计重组型的数目，除以总数（亲组型数+重组型数），就可得到重组百分比，或称重组值，遗传学上用除去%的重组值为两基因的距离。根据上面所得到的实际数字计算如下：

亲组型：536+515=1051

重组型：112 + 120=232

重组值为 $\frac{112 + 120}{1051 + 232} \times 100\% = 18.08\%$

这说明 (b) 和 (vg) 之间的距离为 18.08。但这个数值还有标准差，根据公式 $\sqrt{p(1-p)/n} \times 100\%$ (P 为重组值，n 为总数)。所以得出的标准差是 $\sqrt{0.1808(1-0.1808)/1283} \times 100\% = 1.07\%$ 。

因此这个重组值可写成 $18.08 \pm 1.07\%$ 。

b. 若用黑体长翅 $b+/b+$ 为 κ_0 ，灰体残翅 $+vg/+vg$ 为 κ_0 进行杂交， F_1 也是杂合体的野生型 $b+/+vg$ ，但这是相斥相。取 F_1 再与双突变型 bvg/bvg 回交，同样得到大量的亲组型和少量的重组型，同样可以用图表示，因与 (a) 基本相同，不再重复，与 (a) 不同之处是亲组型和重组型刚好相反：

	黑长	黑残	灰长	灰残	合计
数 目	1415	294	328	1432	3469

其中黑长和灰残为亲组型，黑残和灰长为重组型，经计算，这种交配方式得到的重组值为：

$\frac{328 + 294}{3469} \times 100\% = 17.9\%$

标准差为 $\sqrt{0.179(1-0.179)/3469} = 0.65\%$

所以这个实验的重组值是 $17.9 \pm 0.65\%$ 。

a 和 b 两种不同的交配，得到的重组值基本一致，这说明基因之间的交换重组，只与基因的位置有关而与交配的类型无关，所以重组值大小可作为基因间的距离，两次重组值的差异可看作取样误差。

六、实验步骤

1. 收集雌性亲本的处女蝇。在本实验中亲代和 F_1 的雌蝇都应该用处女蝇。
2. 准备好培养基，把已麻醉的 和 果蝇，按其交配方式分别放入不同培养瓶内，进行杂交，贴上标签（标签方式与伴性遗传实验相似）。
3. 6—7 天后，见到 F_1 幼虫出现，可倒出亲本（倒干净！）。
4. 再过 3—4 天，检查 F_1 成蝇性状。应该都是野生型（灰身、长翅），若性状不符，表明实验有差错，不能再进行下去（错误的可能原因见伴性遗传实验）。
5. 选 5—6 只 F_1 处女雌蝇，再与双突变型雄蝇进行测交。贴上标签。
6. 6—7 天后倒出 F_1 蝇和双突变型 蝇（倒干净！）。
7. 再过 3—4 天， F_2 成蝇出现，麻醉后倒在白瓷板上，按其表型进行统计，可每隔两天统计一次，连续 6—7 天。统计方式如下：

子代表型	灰长	灰残	黑长	黑残
统计日期				
合计				

七、实验结果的检验

实验中所得到的数据，是否符合于理论值，要进行统计处理。分离比和重组值的检验，通常用 χ^2 法（见伴性遗传实验），根据本实验数据计算结果如下：

交配方式： F_1 × 双突变型

即 $++/bvg \times bvg/bvg$

	理论比	实验值 (O)	理论值 (C)	(O-C)	(O-C) ²	(O-C) ² /C
灰长						
灰残						
黑长						
黑残						
合计						

根据遗传学连锁图记录，(b) 和 (vg) 之间的重组值为 18.5%，以此值为理论值。因此重组型的理论比各为 $18.5\% \div 2 = 0.0925$ 。亲组型的理论值是 $(1 - 18.5\%) \div 2 = 40.75$ ，有了理论值，可与实验值进行比较。

实验七果蝇的三点试验

一、实验原理

基因图距是通过重组值的测定而得到的。如果基因座位相距很近，重组率与交换率的值相等，可以根据重组率的大小作为有关基因间的相对距离，把基因顺序地排列在染色体上，绘制出基因图。可是如果基因间相距较远，二

个基因间往往发生二次以上的交换，这时如简单地把重组率看作交换率，那么交换率就要低估了，图距自然也随之缩小了。这时需要利用实验数据进行校正，以便正确估计图距。根据这个道理，可以确定一系列基因在染色体上的相对位置。例如 a、b、c 三个基因是连锁的，要测定三个基因的相对位置可以用野生型果蝇（+++，表示三个野生型基因）与三隐性果蝇（a，b，c 三个突变隐性基因）杂交，制成三因子杂种 abc/+++，再把雌性杂种与三隐性个体测交，由于基因间的交换，从而在下代中得到 8 种不同表型的果蝇，这样经过数据处理，一次试验就可以测出三个连锁基因的距离和顺序，这种方法，叫做三点测交或三点试验。

二、实验目的

1. 了解绘制遗传学图的原理和方法
2. 学习实验结果的数据处理

三、实验材料

黑腹果蝇品系：

野生型果蝇（+++）长翅、直刚毛、红眼。

三隐性果蝇（msn³w）小翅、焦刚毛、白眼。

四、实验器具和药品

1. 用具：解剖镜，麻醉瓶，海绵，毛笔，镊子，吸水纸，培养瓶。
2. 药品：乙醚。

五、实验说明

1. 性状特征：三隐性果蝇（msn³w）个体的翅膀比野生型的翅短些，翅仅长至腹端，称小翅（m），刚毛是卷曲的，称焦刚毛（sn³）或卷刚毛，眼睛是白色（w）。这三个基因都在 X 染色体

2. 交配方式：把三隐性雌蝇与野生型雄蝇杂交，所得子一代的雌蝇是三

因子杂种 $\frac{msn^3w}{+++}$ ，雄蝇是 $\frac{msn^3w}{Y}$ 。（横线——表示一条 X 染色体，箭头横线 表示一条 Y 染色体）。子一代雌、雄果蝇相互交配，得测交后代，如图 7-1 所示。

子一代的雌蝇表型是野生型，雄蝇是三隐性。得到的测交后代其中多数个体与原来亲本相同。同时也会出现少量与亲本不同的个体，称重组型。重组型是基因间发生交换的结果（图 7-2）。

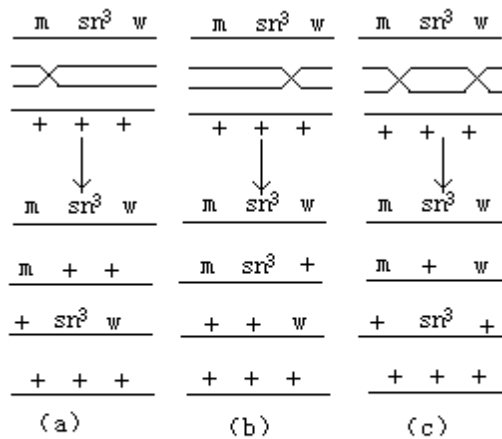


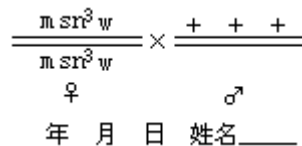
图7-2 在连锁的三对基因杂种里，交换可以发生在 $m \sim sr^3$ 间 (a)，可以发生在 $sr^3 \sim w$ (b)，或者同时发生在 $m \sim sr^3$ 间和 $sr^3 \sim w$ 间 (c)。总共可以产生八种不同配子

子一代雌蝇是三因子杂合体，可形成八种配子，而子一代雄蝇是三隐性个体，所以子一代雌雄蝇相互交配时，子二代可得到八种表型。根据八种表型的相对频率，可以计算重组值，并确定基因排列顺序。

3. 图距和重组值的关系：图距表示基因间的相对距离，通常是由二个邻近的基因图距相加得来的。重组值表示了基因间的交换频率，所以图距往往并不同于重组值。图距可以超过 50%，重组值只会逐渐接近而不会超过 50%，只有基因相距较近时，图距才和重组值相等。

六、实验步骤

1. 收集三隐性个体的处女蝇，培养在培养瓶中，每瓶 5—6 只。
2. 杂交：挑出野生型雄蝇放到处女蝇瓶中去杂交，每瓶 5—6 只。



贴好标签，在 25 中去培养。

3. 7—8 天以后，出现蛹。倒去亲本。

4. 再 4—5 天后，蛹孵化出子一代 (F_1) 成蝇，可以观察到 F_1 雌蝇全部是野生型表型，雄蝇都是三隐性。

5. 从 F_1 代中选 20—30 对果蝇，放到新的培养瓶中继续杂交。每瓶 5—6 对。

6. 7—8 天后，蛹出现，倒去亲本。

7. 再 4—5 天后，蛹孵化出子二代 (F_2) 成蝇，开始观察。

8. 把 F_2 果蝇倒出麻醉，放在白瓷板上，用实体显微镜检查眼色、翅形、刚毛。各类果蝇分别计数。检查过的果蝇倒掉。过 2 天后再检查第二批，连续检查 8—10 天，即 3—4 次。在 25 下，自第一批果蝇孵化出 10 天内是可靠的，再迟时 F_3 代可能会出现。要求至少统计 250 只果蝇。

七、实验结果

按下列顺序填表和计算（所列数字系举例说明）。

1. 先写出所得到的 F_2 代八种表型，填上观察数，计算总数。

表 7-1 三点测交试验中观察的记录

	测交后代表型	观察数	重 组 发 生 在		
			m-sn ³	m-w	w-sn ³
{	sn ³ w m	372	-	-	-
	+ + +	285	-	-	-
{	+ w +	95	-	-	-
	sn ³ + m	97	-	-	-
{	sn ³ + +	4	+	-	+
	+ w +m	4	+	-	+
{	+ + m	91	+	+	-
	sn ³ w +	52	+	+	-
	总计	1000	151	335	200
	重组值		15.1%	33.5%	20.0%

2. 填写“基因是否重组一栏”。因为测交亲本是三隐性，所以若基因间有交换，便可在表型上显示出来。因而从测交后代的表型便可推知某二个基因是否重组。

3. 计算基因间的重组值：

$$m\text{—}sn^3 \text{ 间的重组值} = \frac{151}{1000} \times 100\% = 15.1\%$$

$$m\text{—}w \text{ 间的重组值} = \frac{335}{1000} \times 100\% = 33.5\%$$

$$w\text{—}sn^3 \text{ 间的重组值} = \frac{200}{1000} \times 100\% = 20.0\%$$

4. 画遗传学图：

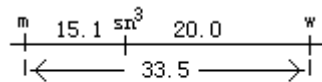


图7-3 X染色体上三基因的定位

m—w 间重组值小于 m—sn³ 间和 sn³ - w 间重组值之和，这是什么原因？

5. 计算双交换值：

m-w 间重组值小于 m-sn³ 与 w-sn³ 间重组值之和，这是因为两个相距较远的基因发生了双交换的结果。而这种发生了双交换的果蝇在基因顺序尚未揭晓时，也就是说，当遗传学图还没有画出时，是难以确定的。遗传学图画出以后，可以分析出 m-w 间发生双交换能产生两种表型的果蝇：m+w（小翅、直刚毛、白眼）和+sn³+（长翅、卷刚毛、红眼）。这两种果蝇计有八只，在计算 m-w 间重组值时，这个值没有被计算进去。二个相距较远的基因的重组值被低估了。低估的值是

$$8/1000 \times 100\% = 0.8\%$$

因为是双交换，所以再乘以 2，得 0.8% × 2 = 1.6%。这就是校正值。画出图距。

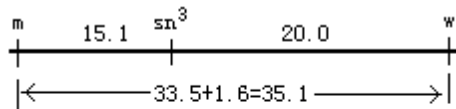


图7-4 把双交换值考虑进去后，m-w间重组值刚好等于m-sn³与sn³-w间重组值之和

6. 计算并发率和干涉：

如果两个基因间的单交换并不影响邻近两个基因的单交换，那么预期的双交换频率应等于两个单交换频率的乘积。但实际上观察到的双交换频率往往低于预期值。因为每发生一次单交换，它邻近也发生一次交换的机会就减少一些，这叫做干涉。一般用并发率来表示干涉的大小。

$$\text{并发率} = \frac{\text{观察到的双交换频率}}{\text{两个单交换频率的乘积}}$$

$$\text{干涉} = 1 - \text{并发率}$$

在上例中：

$$\text{并发率} = \frac{0.8\%}{15.1\% \times 20.0\%} = 0.26$$

$$\text{干涉} = 1 - 0.26 = 0.74$$

实验八果蝇同工酶的遗传学分析

一、实验原理

同工酶是指那些催化功能相同，而分子构型不同的酶。酶蛋白分子的不同，反映了为它们编码基因的 DNA 的碱基顺序不同。利用凝胶区带电泳可以将不同的同工酶分离，并利用特异底物染色法使它们在凝胶上显示出迁移率不同的活性区带。这样基因的产物就直接反映出来了。比较亲代与子代的酶带，就可以对控制它们的基因进行遗传分析。如同其他的形态标记，同工酶作为生化遗传标记已广泛应用于基因作图、发育遗传学、群体遗传学、分类学等多个领域。同工酶电泳分析是一种重要而用途广泛的分子生物学方法。

二、实验目的

1. 掌握聚丙烯酰胺凝胶电泳分离同工酶的技术
2. 了解黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 酯酶同工酶 Est-6 的遗传方式
3. 学习重组值的估计方法

三、实验材料

黑腹果蝇的三个品系：野生型 (wildtype)、残翅 (vestigialwing)、黑檀体 (ebonybodycolor)

四、实验器具和药品

直流稳压电泳仪 (VIW- 型)，垂直平板电泳槽，磨口梨形真空抽气瓶，0.2 毫升玻璃匀浆器，50 微升微量注射器，离心机 (3500 转/分)，吸管，培养大指管，毛笔，麻醉瓶，小镊子，瓷盘。

试剂配制：

1. 凝胶组成液：

a、Tris-柠檬酸缓冲液：Tris 15 克、柠檬酸 1.25 克用蒸馏水溶解，调 pH=8.9，定容至 1000 毫升。

b、丙烯酰胺 24 克，用 a 液溶解，定容至 100 毫升。

- c、甲叉双丙烯酰胺 0.75 克，用 a 液溶解，定容至 100 毫升。
- d、乙二胺四乙酸二钠 0.187 克，溶于 15 毫升 a 液中。
- e、四甲基乙烯二胺原液。
- f、过硫酸胺 0.4 克，溶于 10 毫升蒸馏水中。
- g、丙烯酰胺 10 克、甲叉双丙烯酰胺 2.5 克，溶于蒸馏水中，定容至 100 毫升。

2. 电极缓冲液：

Tris 6.2 克、甘氨酸 2 克，溶于 100 毫升蒸馏水中，pH=8.7，用时稀释 50 倍。

3. 样品匀浆液：

蔗糖 1.5 克，溴酚蓝 0.01 克，Triton x 1000.05 克溶于 10 毫升蒸馏水中。

以上溶液全部放入冰箱，0—4℃ 保存。f 液用新鲜配制的或贮存期二周内的。其他溶液均可贮存二个月。

4. 染色缓冲液（0.1mol/L 磷酸缓冲液）：

14.2 克磷酸氢二钠溶于水中，用 2mol/L HCl 调 pH 至 6.5，定容至 1000 毫升。

5. 底物溶液：- 萘乙酸 1 克、 萘乙酸 0.25 克，溶于 25 毫升丙酮内

6. 脱色固定液：

水 甲醇 冰醋酸=5 5 1

五、实验说明

1、黑腹果蝇的酯酶-6 (Est-6) 酶带有三型，一型是仅有一条迁移率较大的酶带，这酶带在凝胶上泳动较快，称为 F 带，另一型仅有一条泳动较慢的带，这酶带称为 S 带，第三型是有两条酶带，一条 F 带和一条 S 带。实质上三种表型是由 Est-6^F 与 Est-6^S 一对等位基因的组合不同决定的（参见图 8-1）。前二型分别是纯合体 Est - 6^F/F 和 Est - 6^S/S，而第二型是杂合体 Est-6^F/S。

2. Est - 6 酶带在蛹期不显示，成虫刚刚羽化时也不显示，所以作电泳分析时，如为新羽化的成虫，应转入另一培养瓶中饲养二天以上，方能清晰地显示 Est-6 酶带。

3. 本实验采用聚丙烯酰胺凝胶薄层（1mm）垂直平板电泳，具有较高的分辨率，可将带有不同电荷的酶蛋白分子分开，并且聚丙烯酰胺凝胶具分子筛的作用，也可将分子构型，大小不一的酶蛋白分子分开。由于在同一块凝胶上、同一条件作多个样品的分析，所以便于比较。

4. 凡含丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺的溶液均有神经性毒，慎勿沾于皮肤及粘膜上。

六、实验步骤

1. 将野生型、残翅、黑檀体三个品系的果蝇分别作单对交配，即将单只处女蝇和单只雄蝇放入同一培养大指管中。放若干管。待一周后将产完卵的亲本果蝇移出。

2. 对移出的亲本果蝇作 Est-6 的电泳分析，步骤如下（参见图 8-2）：

（1）吸取 a 液 4.9 毫升、b 液 3.75 毫升、c 液 3.35 毫升、d 液 0.325 毫升、e 液 25 微升混匀，置梨形真空抽气瓶中抽气 3—4 分钟，加入 f 液 0.125 毫升摇匀，慢慢倒入大小为 16 × 15 × 0.1cm 的垂直板电泳槽的二块玻璃板间。

玻板二边和底部预先以 a 液配的 1% 琼脂糖凝胶封住。倒入后要求一无气泡、二不渗漏。随

即以吸管铺上 1-2 厘米高的水层，这样凝胶聚合后，面上可呈水平。

(2) 在室温下经 20 分钟后，凝胶与水层间出现折光不同的界面时，说明凝胶已聚合。倒去水层，用滤纸吸尽余水。该层为分离胶。

(3) 吸取 a 液 2.95 毫升、g 液 1 毫升、e 液 5 微升、f 液 0.05 毫升，混匀后倒入分离胶上部，然后插上样品梳。过 30 分钟后即聚合，该层为浓缩胶。小心抽出样品梳，这样在浓缩胶面上就留下间隔开的加样槽。用滤纸条吸净加样槽内残存的溶液。上下电泳槽分别注入电极缓冲液。

(4) 凝胶聚合时间可进行样品处理。将记录好形态特征的待分析果蝇置于编好号的 0.2 毫升玻璃匀浆器中，加入 15 微升样品匀浆液，在冰浴中匀浆。匀浆完毕，置离心机中，以 3500 转/分离心三分钟。

(5) 以微量注射器吸取上清液 10 微升，加入加样槽内，针头接近槽底，慢慢注入，防止扩散。

(6) 在 4℃ 冰箱内以 300 伏特电压开始电泳，方向从负极到正极。当溴酚蓝进入分离胶后，可将电压提至 450 伏特，大约 2.5 小时后，溴酚蓝到达底部标线处，即可结束电泳。

(7) 撬开玻板，小心取下凝胶，投入染色液中，染色液以染色缓冲液 30 毫升，坚牢蓝 RR10 毫升，底物溶液 1 毫升组成。室温下 20 分钟后酯酶同工酶带已清晰显示，其中紫红色醒目的即为 Est - 6 酶带（参见图 8-1）。

(8) 取出凝胶用水冲净后投入脱色固定液中漂洗过夜。脱去底色后，酶带更为清晰。可制成干片永久保存，或浸清水内，经常换水，足供一年观察。

3. 选出雌蝇和雄蝇的 Est - 6 表型均为 F 带或 S 带的纯合子的培养指管，该类培养指管出来的子代即可留作为 F 带纯合子或 S 带纯合子。

4. 作不同品系间不同纯合子间的交配。正反交都可以，但母本须用处女蝇。每只指管放 2—3 对。

5. 一周后将亲本移出。待 F 代出现后，移入新的培养指管中，每管放 2—3 对。此时雌蝇无须处女蝇。

6. 一周后将 F₁ 移出，观察表型，并进行 Est - 6 电泳分析。

7. F₂ 代成虫出来后，移入新的培养指管饲养二天以上后，取出麻醉，区别表型，再作 Est - 6 电泳分析。约 7—8 天成虫基本上可统计完毕（以上实验步骤可参见图 8 - 3）。

七、实验结果统计

按下列表格记录实验中每个交配组的数据。

果蝇 Est - 6 遗传分析实例

A 组交配：

亲本表型		F ₁ 表型		F ₂ 表型					
形态	Est - 6	形态	Est6	野生型			残翅		
残翅	S	全部	全部	F	F/S	S	F	F/S	S
野生型	F	野生型	F/S	21	44	23	8	14	16

B组交配：

亲本表型		F ₁ 表型		F ₂ 表型					
形态	Est-6	形态	Est-6	野生型			黑檀体		
黑檀体	S	全部	全部	F	F/S	S	F	F/S	S
野生型	F	野生型	F/S	15	20	2	0	5	7

1. 从 A 和 B 二组交配来看，Est - 6 表型均为 F/S，可见 Est-6^F 与 Est-6^S 这一对等位基因是共显性的。

按孟德尔分离定律，F² 时形态标记应作 3 : 1 分离，即 A 组野生型 : 残翅 = 3 : 1，B 组野生型 : 黑檀体 = 3 : 1。而 F² 时 Est - 6 应分离为三型，即 F : F/S : S = 1 : 2 : 1。下面是实验结果和相应的 χ^2 测验：

A 组实验：

F ₂	形态标记		Est-6		
	野生型	残翅	F	F/S	S
实得数	88	38	29	58	39
预期数	94.5	31.5	31.5	63	31.5
χ^2	1.788		2.361		
自由度	n=1		n=2		
P	0.20 > P > 0.10		0.50 > P > 0.30		

B 组实验：

F ₂	形态标记		Est-6		
	野生型	黑檀体	F	F/S	S
实得数	37	12	15	25	9
预期数	36.75	12.25	12.25	24.50	12.25
χ^2	0.0067		1.472		
自由度	n=1		n=2		
P	0.95 > P > 0.90		0.70 > P > 0.50		

2. 将 Est-6 与形态基因同时考虑，看二对基因在 F₂ 是否符合孟德尔的自由组合定律：

A 组：F₁ +/vgEst - 6^{F/S} × F₁ +/vgEst - 6^{F/S}

如果这两对基因是自由组合的，按棋盘格法配列，应得如下结果（见下页）。

归纳棋盘格内各基因型，并根据显隐性关系，可得到 F₂ 的

配子	+ Est-6 ^F	+ Est-6 ^S	vgEst-6 ^F	vgEst-6 ^S
+ Est-6 ^F	+ / + Est-6 ^F /F	+ / + Est-6 ^F /S	+ /vgEst-6 ^F /F	+ /vgEst-6 ^F /S
+ Est-6 ^S	+ / + Est-6 ^F /S	+ / + Est-6 ^S /S	+ /vgEst-6 ^S /S	+ /vgEst-6 ^S /S
vgEst-6 ^F	+ /vgEst-6 ^F /F	+ /vgEst-6 ^F /S	vg/vgEst-6 ^F /F	vg/vgEst-6 ^F /S
vgEst-6 ^S	+ /vgEst-6 ^F /S	+ /vgEst-6 ^S /S	vg/vgEst-6 ^F /S	vg/vgEst-6 ^S /S

表型比为：[+ , F] [+ , F/S] [+ , S] [vg , F] [vg , F/S] : [Vg , S]

$$= \frac{3}{16} : \frac{6}{16} : \frac{3}{16} : \frac{1}{16} : \frac{2}{16} : \frac{1}{16}$$

这里 [+ , F] 表示野生型，F 带，其余类推。现在根据表型比例求出 A 组实验的预期数与实得数比较进行 χ^2 测验。

F ₂	+ , F	+ , F/S	+ , S	vg , F	vg , F/S	vg , S
实得数	21	44	23	8	14	16
预期数	23.625	47.25	23.625	7.875	15.75	7.875
χ^2 [5]	9.11					
P	0.20 > P > 0.10					

得到的 χ^2 值为 9.11，自由度为 5，查 χ^2 表，得 P=0.20—0.10，所以可以认为有关那对性状的 F² 分离是符合独立分配的。从而我们就决定这两对性状的基因位于不同的染色体上。

B 组的交配方式为：F₁ + /eEst-6^F/S × F₁ + /eEst-6^F/S 根据两对基因是自由组合的假设，可求得 F₂ 的各种表型的分离比，按 A 组棋盘格法归纳可得：

$$[+ , F] [+ , F/S] [+ , s] [e , F] [e , F/S] [e , s] = \frac{3}{16} : \frac{6}{16} : \frac{3}{16} : \frac{1}{16} : \frac{2}{16} : \frac{1}{16}$$

此处 [e , F] 表示黑檀体，F 带，余类推。

由此计算预期数与实得数比较求 χ^2 ，以下表表示：

F ₂	+ , F	+ , F/S	+ , S	e , F	e , F/S	e , S
实得数	15	20	2	0	5	7
预期数	9.18	18.36	9.18	3.06	6.12	3.09
χ^2 [5]	17.78					
P	P < 0.01					

实验中，根据两对基因自由组合，求得 F₂ 的 6 种表型的预期数，与实得数相比，两者相差较大。 χ^2 测验的 P 值小于 0.01，表明 Est-6 基因与黑檀体基因不是自由组合的，而是在同一染色体上有连锁关系。

3. 用最大似然法求 Est-6 ~ e 重组值

已知 Est-6 与 e 是连锁的，现在进一步要估计这两基因的重组值。这要用到最大似然法 (maximum likelihood method)，其原理如下：

设 P 为重组值， m_1, m_2, \dots, m_t 是分离出来各组的预期比例， a_1, a_2, \dots, a_t 是相应各组的实得数。符号为 m 的预期值可用 P 来表示，这 P 值就是我们所要估计的。

得到我们实验中观察到的一套数值的可能性或似然性，可用多项式 $(m_1 + m_2 + \dots + m_t)^n$ 的展开中的一项来表示，其中 n 是这套数据的合计。在这展开式中有关的一项是

$$\frac{n!}{a_1! a_2! \dots a_t!} (m_1)^{a_1} (m_2)^{a_2} \dots (m_t)^{a_t}$$

最大似然法的目的就是要求出一个 P 来，把这个 P 代入公式中可以得到最大值。但要对这个公式进行微分是有困难的，幸而这公式本身和这公式的对数在同一 P 值有最大值，所以取这公式的对数，并对 P 进行微分。

似然性公式用 L 表示，则

$$L = \ln \frac{n!}{a_1! a_2! \dots a_t!} + a_1 \ln m_1 + a_2 \ln m_2 + \dots + a_t \ln m_t$$

对 P 进行微分，并使之等于 0，则得估计方程式 (equation of estimation)

$$\frac{dL}{dP} = a_1 \frac{d \ln m_1}{dP} + a_2 \frac{d \ln m_2}{dP} + \dots + a_t \frac{d \ln m_t}{dP} = 0$$

这公式的答数之一就是我们要的 P 值。不会有那个根都是我们需要的问題，因为所有其他答数都不可能作为重组值的。

现在回到我们具体的例子，杂交组合是

$$F_1 \frac{eEst-6^S}{+Est-6^F} \times F_1 \frac{eEst-6^S}{+Est-6^F}$$

雌性双杂合体产生的配子有 4 种，两种是亲代原有的组合，或亲组合；两种是亲代没有的新配合，或重组合。雄蝇的连锁是完全的，所以双杂合体产生的配子只有两种，都是亲组合。设 P 为 e ~ Est-6 间的重组值，则可得出雌蝇四种配子的比例，并可求得 F₂ 的表型比例。

配子 \ 配子	(1-p)/2 eEst-6 ^S	P/2 eEst-6 ^F	P/2 +Est-6 ^S	(1-p)/2 +Est-6 ^F
$\frac{1}{2}$ e, Est-6 ^S	[e, S]	[e, S/F]	[+, S]	[+, F/S]
$\frac{1}{2}$ +, Est-6 ^F	[+S/F]	[+, F]	[+, F/S]	[+, F]

把上表中的表型按类别归纳，各乘以总数 n。得预期数，然后再写上各表型的实得数

有了实得值，又有了预期值，我们就可以代入上述似然性方程式，并略去第一项，因为这一项在微分时消失。

$$L = 7 \ln\left(\frac{1-P}{4}\right) + 5 \ln\left(\frac{P}{4}\right) + 2 \ln\left(\frac{P}{4}\right) + 20 \ln\left(\frac{2P}{4}\right) + 15 \ln \frac{1}{4}$$

对上式微分，并使之等于 0，则估计方程式成为

$$\frac{dl}{dp} = -\frac{7}{1-P} + \frac{5}{P} + \frac{2}{P} - \frac{20}{2-P} = 0$$

移项整理后，得

$$34P^2 - 55P + 14 = 0$$

$P = 0.3165$ 或 31.65%。得出 P 的估计值后，我们还想知道它的标准误差 (S_p)。Fisher 已经证明

$$-\frac{1}{S_p^2} = \sum \left[nm \frac{d^2 \ln m_t}{dp^2} \right]$$

在我们现在这个例子中，计算是不难的。我们已经有了 $a \frac{d \ln m}{dP}$ ，我们只要再微分一次，然后用预期值代替观察值，那就是说用 mn 代替 a ，这样就得到

$$-\frac{1}{S_p^2} = -\frac{n}{4} \left(\frac{1}{1-P} + \frac{1}{P} + \frac{1}{P} + \frac{1}{2-P} \right)$$

把 P 的估计值代入，得 $S_p^2 = 0.009746$ ，从而 $S_p = 0.0987$ 或 9.87%。查果蝇基因图，得知基因 e 位于第三染色体。现在根据第二代的分离比， $Est-6$ 与 e 连锁，有 31.65% 重组值，所以 $Est-6$ 也在第三染色体上，与 e 的图距为 31.65。

实验九 数量性状实验

一、实验原理

有些性状，如身体大小、生长速度等，可用某种尺度来测量，由数字来表示，这样的性状叫做数量性状 (quantitative character)。数量性状大都由很多基因支配，其中每个基因的作用很小，但有关的基因数目很多，又受到环境的影响，所以它们的表型呈连续分布。在这种情况下，用通常的遗传学方法追查各个基因的行为是困难的。因此，在数量性状的遗传学分析方面，应用统计遗传学方法。

二、实验目的

以黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 腹部着生的小刚毛数为对象，研究数量性状遗传的特点。学习估计统计遗传学基本参数之一——遗传率 (heritability)。

三、实验材料

黑腹果蝇：实验室中维持多年的系统，因近交系数高，缺乏遗传的变异，所以不合适。应该利用野外采集的果蝇，或把两个不同的实验室品系杂交，再把 F_1 个体相互交配，利用它们的 F_2 代。培养供试果蝇时，幼虫期避免过密，在 20 左右、稍稍低温下饲养，这样成虫个体大，容易观察和计数。

四、实验器具和药品

双筒显微解剖镜 ($\times 40-60$)，照明装置，麻醉瓶，白瓷板，尖头镊子，吸虫管，乙醚或三乙基胺 (triethylamine)，盛有培养基的饲养瓶，指管 (直

径 15mm 左右)，棉花塞等。

五、实验说明

1. 统计遗传学基础

用统计学方法处理数量性状时，作为基础的模型是：个体的表型值（P）可由基因型值（G）与环境影响（E）之和表示，即 $P=G+E$ (1)

在这里，E 是随机效应，群体的平均是 0；换句话说，表型值的群体平均与基因型值的群体平均一致。我们直接观察的是表型值和它的方差。于是根据这些数值就可估计基因型值。现在假定，基因型值与环境效应之间没有相互作用，那么根据上面的模型，表型方差（ V_P ）是基因型方差（ V_G ）与环境方差（ V_E ）之和。

$$V_P=V_G+V_E \quad (2)$$

其次，根据前面的假设，表型值与基因型值的慢方差 [$\text{Cov}(G \cdot P)$] 是

$$\text{Cov}(G \cdot P)=\text{Cov}[G(G+E)]$$

$$=\text{Cov}(G \cdot G)+\text{Cov}(G \cdot E)$$

$$=\text{Cov}(G \cdot G)=V_G$$

与基因型方差一致。现在考虑基因型值对表型值的线性回归，其回归系数是

$$b_{GP} = \frac{\text{Cov}_{(G \cdot P)}}{V_P} = \frac{V_G}{V_P} \quad (3)$$

这回归系数称为广义遗传率 (heritability in the broad sense)，用 H^2 表示。从 (3) 式可知，这是基因型方差在表型方差中所占的比例。从而 $0 \leq H^2$

≤ 1 。如采用某种方法可以知道 H^2 ，那么根据某个体的表型值就可以由下面的回归式估计其基因型值

$$(G - \bar{G}) = b_{GP}(P - \bar{P}) = H^2(P - \bar{P}) \quad (4)$$

式中， \bar{G}, \bar{P} 分别表示基因型值与表型值的群体平均。在这里，必须假定表型值与基因型值间是线性关系；但实际上由于等位基因间的显隐性关系，不可能是这样简单。因为这个缘故，为方便计算，把基因型值分割为二，一为相加效应 (A)，其表型效应与基因数成比例，另一为显性偏差 (D)，是与相加效应的差数。这样，(1) 式和 (2) 式可分别表示如下：

$$P=A+D+E \quad (1)$$

$$V_P=V_A+V_D+V_E \quad (2)$$

这里，相加的遗传方差 (V_A) 对表型方差的比例 (V_A/V_P)，称作狭义遗传率 (heritability in the narrow sense)，用 h^2 表示。单称遗传率时，通常是指狭义遗传率。如后面将要提到的那样，遗传率是表示选择对象的遗传变异量，是数量遗传学中重要参数之一。又在家畜和作物育种中，在决定采用那种育种方式时，遗传率大小就是参考的标准。一般地说，生活力和育性等与生物的适应度有密切关系的性状，遗传率小，通常在 0.2 以下；反之，身体大小和刚毛数等，可以得到 0.3—0.5 那样较大的数值。

2. 根据选择实验估计遗传率

在群体中对某性状进行选择，选出一定比例的最上方（或最下方）个体。把这些入选个体繁育，产生下一代。下一代的群体平均一般向选择的方向移

动，移动的范围跟亲代群体的相加遗传方差成正比。现在设亲代的群体平均为 \bar{P}_0 ，选出的亲体的平均值为 \bar{P}_s ，则 $\bar{P}_s - \bar{P}_0 = P$ ，表示所加的选择强度，称为选择差 (selection differential)。P 以标准差 (σ_p) 为单位来表示，即 $P / \sigma_p = i$ ，称为标准选择差。设次代的群体平均为 \bar{P}_1 ，

$$\bar{P}_1 - \bar{P}_0 = G$$

这是由选择而产生的群体平均的变化量，称为遗传获得量 (genetic gain) (图 9-1)。参照 (4) 式，可知在这些数值间成立以下的关系：

图 9-1 表示选择差 (P) 与遗传获得量 (G) 的关系的模式图描点部分表示入选个体，它们被用于繁殖，作为下一代的亲体 (参照本文)

$$G = h^2 P = h^2 \sigma_p i$$

由此

$$h^2 = \frac{G}{\sigma_p i} \quad (5)$$

用这关系，可从遗传获得量估计遗传率。这里估计出来的是狭义遗传率，这时特称“实现遗传率” (realized heritability)。

六、实验步骤

1. 以两个近交系杂交而得的 F_2 作为亲代群体，从中随机地选出处女蝇和雄蝇各 20 只，轻度麻醉，在显微解剖镜下计数第 4 与第 5 腹板上的刚毛数。把每一个体两腹板的刚毛数合计，再选出刚毛数最多的雌雄蝇各 2 只，刚毛数最少的雌雄蝇各 2 只。此时如不熟练，一次麻醉计测 20 只是有困难的，所以分几次麻醉，把计测过的果蝇放入指管，每管一只，这样做也是可以的。用三乙基胺时，麻醉时间长，这是方便之处，但也要注意，不要麻醉过头。还有，腹板位置，雌雄蝇稍有不同，参照图 9-2，以期不误。

2. 计测完毕后，把刚毛数多的，和刚毛数少的各取雌雄两只，移入另外的饲养瓶内，使之交配。在第 2—3 日确实看到产卵后，倒去亲代果蝇。这样完成了刚毛数多的一代选择与刚毛数少的一代选择。

3. 第二代羽化后，从两只饲养瓶分别随机地取出雌雄各 20 只，与亲代同样地计测刚毛数。

4. 结果整理

亲代的平均和方差，高低两方向的两个选择系统的平均和方差如表 9-1。在这实验中，向两个方向进行选择，假定选择效应两方向相等，两个选择系统的平均值之差 ($\bar{H} - \bar{L}$) 是遗传获得量 (G) 的两倍。雌雄平均值明显不同，但计测的雌雄数相同，所以取其平均。

表 9-1 对黑腹果蝇的第 4、第 5 腹板刚毛数
进行一代选择实验的结果

	雌 (20 只)		雄 (20 只)	
	平均	方差	平均	方差
亲 代	44.85	7.555	37.85	6.239
子 代				
向多的方向选择 (H)	46.50	6.474	40.10	3.674
向少的方向选择 (L)	43.70	6.747	34.85	4.450

$$2 \quad G = \bar{H} - \bar{L} = 43.30 - 39.28 = 4.02$$

$$G = 2.01$$

表型标准差 σ_p 在一代选择中可以说基本上没有变化，所以从亲代与子代的方差平均 (\bar{V}_p) 可以估计表型标准差，即 $\sigma_p = \sqrt{\bar{V}_p}$ 。现在

$$\bar{V}_p = (7.555 + 6.239 + 6.474 + 3.674 + 6.747 + 4.450) = 5.8565$$

$$\sigma_p = \sqrt{5.8565} = 2.420$$

标准选择差 (i) 可从实测值求得，但根据正态分布的性质，也可由入选亲体的比例 (在本实验，20 只中的 2 只，即 10%) 决定，也就是说可从理论上求得。在本实验中，选出的亲体数少，其平均值不很可信，所以通常用理论值。从 20 只中选出 2 只时，理论值是 $i = 1.638$ (见表 9-2)。

表 9-2 标准选择差 (i) 的理论值

选择强度	群 体 大 小				
	10	20	30	50	
0.1	1.539	1.638	1.674	1.705	1.755
0.2	1.270	1.332	1.354	1.372	1.400
0.3	1.065	1.110	1.126	1.139	1.159
0.4	0.893	0.928	0.941	0.951	0.966
0.5	0.739	0.767	0.777	0.786	0.798

把以上数值代入 (5) 式，计算实现遗传率。

$$h^2 = \frac{2.01}{2.420 \times 1.638} = 0.51$$

本实验必须早一天准备必要数目的处女蝇。子代 (F_1) 的计测大约要在二周之后，所以必须和其它实验配合起来。

七、实验结果

1. 收集全体学生的资料，把刚毛数的个体变异作成频度分布图，看是否符合正态分布。

2. 求实现遗传率。根据各人求得的遗传率，计算标准差。

附录一果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的饲养

果蝇具有生活史短、繁殖率高、饲养简便等特点，是研究遗传学的好材料，尤其在基因分离、连锁、交换等方面，对果蝇的研究更是广泛而充分。

一、果蝇的生活史

果蝇属于昆虫纲，双翅目，与家蝇是不同的种。它的生活史包括卵 幼虫 蛹 成虫。

果蝇的生活周期长短与温度关系很密切，30 以上的温度能使果蝇不育和死亡，低温则使它生活周期延长，同时生活力也减低，果蝇培养的最适温度 20—25 。

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

从表中可以看出 25℃ 时，从卵到成虫约 10 天；在 25℃ 时成虫约活 15 天。果蝇一般是培养在恒温箱内，盛夏时，要注意降温。

果蝇有雌雄之分，幼虫期区别较难，成虫区别容易（图 1）。雄性的腹部环纹 5 节，末端钝而圆，颜色深。第一对脚的跗节前端表面有黑色鬃毛流苏，称性梳（sexcombs）。雌性腹部环纹 7 节，末端尖，颜色浅，跗节前端无黑色鬃毛流苏（图 2）。

二、果蝇的繁育

果蝇在水果摊或果园里常可见到，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，均可作为果蝇饲料。目前果蝇饲料较好的配方如下：

A：糖 6.2 克，加琼脂 0.62 克，再加水 38 毫升，煮沸溶解。

B：玉米粉 8.25 克，加水 38 毫升，加热搅拌均匀后，再加 0.7 克酵母粉。

A 和 B 混合加热成糊状后，加 0.5 毫升丙酸，即可分装到培养瓶中。

除了以上的饲料外，常用的还有米粉饲料和香蕉饲料。

1. 米粉饲料的配制：琼脂 0.9—2.5 克加入 100 毫升水中，加热煮沸溶解；再加 10 克红糖，待溶解后将 8 克米粉（或麸皮）倒入正在煮沸的琼脂——红糖溶液中去，不断搅拌煮沸数分钟，待成稀粥状后即可分装使用。

2. 香蕉饲料配制：将熟透的香蕉捣碎，制成香蕉浆（约 50 克）。将 1.5 克琼脂加到 48 毫升的水中煮沸，溶解后拌入香蕉浆，再煮沸后即可分装。

以上两种饲料容易生霉菌，必要时需加少量防霉剂。

培养果蝇的饲养瓶，常用的有牛奶瓶，大中型指管，用纱布包裹的棉花球作瓶塞（有条件的地方可改用泡沫塑料作瓶塞）。饲养瓶先消毒，然后倒入饲料（2 厘米厚），待冷却后，用酒精棉擦瓶壁，然后滴入酵母菌液数滴，再插入消毒过的吸水纸，作为幼虫化蛹时的干燥场所。

三、果蝇处理

对果蝇进行检查时，可用乙醚麻醉，使它保持静止状态。因果蝇对乙醚很敏感，易麻醉，麻醉的深度看实验要求而定（作种蝇以轻度麻醉为宜，做观察可深度麻醉，致死也无妨。果蝇翅膀外展 45° 角表示已死亡）。麻醉后的果蝇放在白瓷板上检查，完毕后倒入煤油或酒精瓶中（死蝇盛留器）。

四、原种培养

在作为新的留种培养时，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，移入新培养瓶时，须将瓶横卧，然后将果蝇挑入，待果蝇清醒过来后，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（按温度而定），每一原种培养至少保留两套。培养瓶上标签要写明名称，培养日期等，作为原种培养，可控制到 10—15 天，培养时避免日光直射。

五、实验交配

果蝇雌体生殖器官有受精囊，可保留交配所得的大量精子，能使大量的卵

受精，因此在做品系间杂交时，雌体必须选用处女蝇。雌蝇孵出后几小时内不会交配，所以把老果蝇除去后，几小时内所收集到的雌体必为处女蝇。由于雌蝇两天内不产卵，所以雄蝇可直接放到处女蝇培养瓶中（也可以放在盛有食物的小瓶中暂养两天，直到雌蝇将要产卵时放回培养瓶中）。贴好标签，写好交配日期，当子蝇即将孵化出来以前，也就是说 23 培养 7—9 天，倒出亲本，以免和亲代混淆。另一方面应该注意，杂交的 F₁ 代的计数安全期是自培养开始的 20 天内（因为再早些时，F₂ 也可能有了）。

（江绍慧）

实验十粗糙链孢霉的杂交

一、实验原理

粗糙链孢霉（*Neurospora crassa*）属于真菌中的子囊菌纲。它是进行顺序排列的四分体的遗传学分析的好材料。粗糙链孢霉的菌丝体是单倍体（ $n=7$ ），每一菌丝细胞中含有几十个细胞核。由菌丝顶端断裂形成分生孢子。分生孢子有两种，小型分生孢子中含有一个核，大型分生孢子中含有几个核。分生孢子萌发成菌丝，可再生成分生孢子，周而复始，这是粗糙链孢霉的无性生殖过程。

粗糙链孢霉的菌株有两种不同的接合型（mating type），用 A、a 或 mt^+ 、 mt^- 表示，它们受一对等位基因控制。不同接合型菌株的细胞接合产生有性孢子，这过程称为有性生殖。有性生殖可以通过两种方式进行：

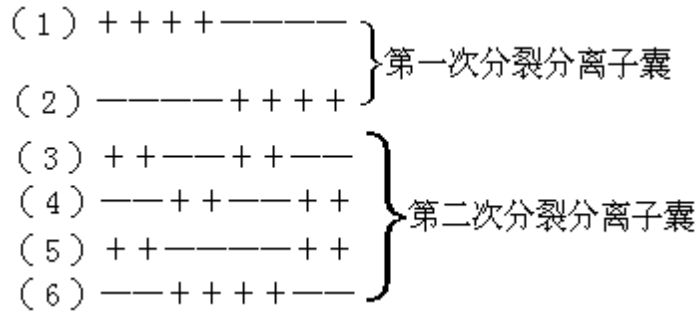
1. 当菌丝在有性生殖用的杂交培养基上增殖时，就会产生许多原子囊果，内部附有产囊体，若另一接合型的分生孢子落在这原子囊果的受精丝上时，分生孢子的细胞核进入受精丝，到达原子囊果的产囊体中，形成接合型基因的异核体。进入产囊体中的分生孢子的核发生分裂，并进入产囊菌丝中，被隔膜分成一对细胞，形成钩状细胞，亦称原子囊。钩状细胞顶端细胞的二个核形成合子，合子核再进行减数分裂，成为四个单倍体的核，就是四分体，再进行一次有丝分裂，变成八个核，顺序地排列在一个子囊中。原子囊果在受精后增大变黑，成熟为子囊果。一个子囊果中集中着三十到四十个子囊，成熟的子囊孢子呈橄榄球状，长 30—40 微米，比 3—5 微米的分生孢子要大得多。子囊孢子如经 60 处理 30—60 分钟，便会发芽，长出菌丝，再度开始无性繁殖（图 10-1）。

2. 不同接合型的菌株的菌丝连接，两种接合型的细胞核发生融合形成合子，产生子囊果。

粗糙链孢霉的子囊孢子是单倍体细胞，由它发芽长成的菌丝体也是单倍体。所以一对等位基因决定的性状在杂交子代中就能分离。在粗糙链孢霉中，一次减数分裂产物包含在一个子囊中，所以很容易看到一次减数分裂所产生的四分体中一对基因的分离，这就直观地证明基因的分离，并证明基因在染色体上。同时由于 8 个子囊孢子顺序地排列在子囊中，这就可以测定着丝粒距离并发现基因转变（gene conversion）。若两个亲代菌株有某一遗传性状的差异，那么杂交所形成的每一子囊，必定有 4 个子囊孢子属于一种类型，4 个子囊孢子属于另一类型，它们的分离比例是 1 : 1，而且子囊孢子按一定顺序排列。如果这一对等位基因与子囊孢子的颜色或形状有关，那么在显微镜下可以直接观察到子囊孢子的不同排列方式。

本实验用赖氨酸缺陷型（记作 Lys^- ）与野生型（记作 Lys^+ ）杂交，得到

的子囊孢子分离为 4 个黑的 (+)，4 个是灰的 (-)。黑的孢子是野生型；赖氨酸缺陷型孢子成熟迟，所以呈灰色。根据黑色孢子和灰色孢子在子囊中的排列顺序，可有 6 种子囊类型。



子囊型 (1) 和 (2) 的产生如图 10-2。第一次减数分裂 (M_1) 时，带有 Lys^+ 的两条染色单体移向一极，而带有 Lys^- 的两条染色单体移向另一极。 Lys^+/Lys^- 这对基因在第一次减数分裂时分离，称第一次分裂分离 (first division segregation)。第二次减数分裂 (M_2) 时，每一染色单体相互分开，形成四分体，顺序是 + + — — 或 — — + +，再经过一次有丝分裂，成为 (1) 和 (2) 子囊型。形成这两种子囊型时，在着丝粒和基因对 Lys^+/Lys^- 间未发生过交换，是第一次分裂分离子囊。

图 10-3 表示子囊型 (3) 和 (4) 的形成。由于 Lys 基因与着丝粒间发生了一个交换， Lys^+/Lys^- 在第一次减数分离时没有分离，到第二次减数分裂 (M_2) 时，带有 Lys^+ 的染色单体才和带有 Lys^- 的染色单体相互分开，所以称为第二次分裂分离 (second division segregation)。然后再经一次有丝分裂，形成 4 个孢子对，顺序是 + + — — + + — — 或 — — + + — — + +。这是第二次分裂分离子囊。

(5) 和 (6) 子囊型的形成与 (3) 和 (4) 类似，也是两个染色单体发生了交换，不过交换不是发生在第 2 条染色单体与第 3 条染色单体之间，而是发生在 1, 3 或 2, 4 两条染色单体之间 (图 10-4)。

从上面的分析可知，第二次分裂分离子囊的出现，是由于有关的基因和着丝粒之间发生了一次交换的结果。第二次分裂分离子囊愈多，则有关基因和着丝粒之间的距离愈远。所以由第二次分裂分离子囊的频度可以计算某一基因和着丝粒之间的距离，称为着丝粒距离。因为交换在两条染色单体之间发生而与另外两条无关，而每发生一次交换，产生一个第二次分裂分离子囊，所以，求出第二次分裂分离子囊在所有子囊中所占的比例，再乘以 $\frac{1}{2}$ ，就可以决定某一基因与着丝粒间的重组值。

着丝粒和基因间的重组值

$$= \frac{\text{第二次分裂分离子囊数}}{\text{子囊总数}} \times \frac{1}{2} \times 100$$

重组值除去%，即作为图距。

某基因的着丝粒距离

$$= \frac{\text{第二次分裂分离子囊}}{\text{子囊总数}} \times \frac{1}{2} \times 100 \text{图距单位}$$

二、实验目的

通过对粗糙链孢霉的赖氨酸缺陷型和野生型杂交所得后代的表现型的分析，了解顺序排列的四分体的遗传学分析方法，进行有关基因的着丝粒距离的计算和作图。

三、实验材料

1. 粗糙链孢霉野生型菌株，Lys⁺，接合型。
2. 粗糙链孢霉赖氨酸缺陷型菌株，Lys⁻，接合型 a。

四、实验器具和药品

1. 器具：显微镜，钟表镊，解剖针，接种针，载玻片，试管，培养皿。
2. 培养基

(1) 基本培养基（野生型可生长，缺陷型不能生长）：50 倍浓度的贮存液

柠檬酸钠 · 2H ₂ O (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	125 克	
KH ₂ PO ₄	250 克	
NH ₄ NO ₃	100 克	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 克	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 克	
生物素溶液 (5 毫克/100 毫升)	5 毫升	
微量元素溶液		
柠檬酸 · 2H ₂ O	5.00 克	} 5 毫升
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.00 克	
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1.00 克	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25 克	
MnSO ₄ · H ₂ O	0.05 克	
H ₃ BO ₃	0.05 克	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.05 克	
蒸馏水	100 毫升	
氯仿	1 毫升	
蒸馏水	1000 毫升	
氯仿 (防腐)	2 — 3 毫升	

用前稀释贮存液，再加 1.5% 的蔗糖，pH5.8。如加 2% 琼脂，即成基本固体培养基。

(2) 补充培养基：在基本培养基上补加一种或多种生长物质，如氨基酸、核酸碱基、维生素等。氨基酸用量一般是 100 毫升基本培养基中加 5—10 毫克。

本实验所用的补充培养基只要在基本培养基中加适量的赖氨酸，赖氨酸缺陷型菌株就能生长。

(3) 完全培养基

基本培养基	1000 毫升	
酵母膏	5 克	
麦芽汁 (亦可不加)	5 克	
酶解酪素	1 克	
维生素混合液		
硫胺素	10 毫克	} 10 毫升
核黄素	5 毫克	
吡哆醇	5 毫克	
泛酸钙	50 毫克	
对-氨基苯甲酸	5 毫克	
菸酰胺	5 毫克	
胆碱	100 毫克	
肌醇	100 毫克	
叶酸	1 毫克	
蒸馏水	1000 毫克	
蔗糖	20 克	

(为获得大量分生孢子, 可用 1% 的甘油代替蔗糖。)

如加 2% 琼脂, 即为完全固体培养基。

(4) 麦芽汁培养基: 可以代替完全培养基, 配方简单。8 波美麦芽汁 2 份, 蒸馏水 1 份, 再加 2% 琼脂。

(5) 马铃薯培养基: 也可以代替完全培养基。将马铃薯洗净去皮, 切碎, 取 200 克, 加水 1000 毫升, 煮熟, 然后用纱布过滤, 弃去残渣, 滤下的汁加 2% 琼脂, 20 克蔗糖, 煮融, 分装到试管中。也可将马铃薯切成黄豆大小的碎块, 每支试管放 3—4 粒, 再加入融化好的琼脂、蔗糖。

上述培养基都需分装到试管后, 在 8 磅压力下消毒 30 分钟, 取出斜摆, 成为斜面备用。

(6) 杂交培养基:

KH_2PO_4	1.0 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 克
KNO_3	1.0 克
NaCl	0.1 克
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.13 克
生物素	20 微克 (或 5 毫克/100 毫升溶液 0.4 毫升)
微量元素溶液	1 毫升
(成分同基本培养基中微量素液配成 4 倍浓度的溶液稀释使用)	
蒸馏水	1000 毫升
蔗糖	20 克
pH6.5	
加 2% 琼脂即成固体培养基。	

(7) 杂交培养基:

将玉米在水中浸软,破碎,每试管放2—3粒,加入少量琼脂(0.1克左右),再放入一小片经多次折叠的滤纸(长约3—4厘米),加上棉塞,消毒即成,不需摆斜面。

3. 药品:5%次氯酸钠(NaClO),5%石碳酸

五、实验步骤

1. 菌种活化:为使菌种生长得更好,先要进行菌种活化。把野生型和赖氨酸缺陷型菌种从冰箱中取出,分别接在两支完全培养基试管斜面上,28℃温箱培养5天左右。培养到菌丝的上部有分生孢子产生。

2. 杂交:接种亲本菌株,可采用下述方法。

(1) 同时在杂交培养基上接种两亲本菌株的分生孢子或菌丝,25℃温箱进行混合培养。注意要贴上标签,写明亲本菌株及杂交日期。在杂交后5—7天就能看到许多棕色的原子囊果出现,以后原子囊果变大变黑成子囊果,在7—14天左右,就可在显微镜下观察。

(2) 在杂交培养基上接种一个亲本菌株,25℃培养5—7天后即有原子囊果出现。同时准备好另一亲本菌株的分生孢子,悬浊于无菌水中(近于白色的悬浊液),将此悬浊液加到形成原子囊果的培养物表面,使表面基本湿润即可(每支试管约加0.5毫升),继续在25℃培养。原子囊果在加进分生孢子1天后即可开始增大变黑成子囊果,7天后即成熟。

3. 显微镜观察:

(1) 在长有子囊果的试管中加少量无菌水,摇动片刻,把水倒在空三角瓶中,加热煮沸,以防止分生孢子飞扬。

(2) 取一载玻片,滴1—2滴5%次氯酸钠,然后用接种针挑出子囊果放在载玻片上(若附在子囊果上的分生孢子过多,可先在5%次氯酸钠中洗涤,再移到载玻片上),用另一载玻片盖上,用手指压片,将子囊果压破,置显微镜下(10×15倍)检查,即可见到30—40个子囊。观察子囊中子囊孢子的排列情况。这里用载玻片盖上压片而不用盖玻片,是因为子囊果很硬,用盖玻片压,盖玻片会破碎。也可在显微镜下用镊子把子囊果轻轻夹破,挤出子囊。如发现30—40个子囊象一串香蕉一样,可加一滴水,用解剖针把子囊拨开。此过程无需无菌操作,但要注意不能使分生孢子散出。观察过的载玻片、用过的镊子和解剖针等物都需放入5%的石碳酸中浸泡后取出洗净,以防止污染实验室。

操作步骤见图10-5。

4. 实验步骤说明

(1) 实验所用的赖氨酸缺陷型,有时接种在完全培养基上,也长不好,需要加适量赖氨酸。

(2) 杂交后培养温度要控制在25℃;30℃以上即抑制原子囊果的形成。

六、实验结果

1. 观察一定数目的子囊果,记录每个完整子囊的类型,计算Lys基因的着丝粒距离。

子 囊 类 型	观 察 数
+++——	
——++++	
++——++——	
——++——++	
++——++	
——++++——	
合 计	

2. 绘一显微镜下观察到的杂交子囊的图。

3. 说明粗糙链孢霉中基因分离现象和高等动物、高等植物中基因分离的主要区别。

4. 用图表示第六种子囊类型的形成。

5. 实验结果说明：

(1) 赖氨酸缺陷型的子囊孢子成熟较迟，当野生型的子囊孢子已成熟而呈黑色时，赖氨酸缺陷型的子囊孢子还呈灰色，因而我们能在显微镜下直接观察不同的子囊类型。但是如果观察时间选择不当，就不能看到好的结果。过早，所有子囊孢子都未成熟，全为灰色；过迟，赖氨酸缺陷型的子囊孢子也成熟了，全为黑色，就不能分清各种子囊类型。所以在子囊果形成期间，要预先观察子囊孢子的成熟情况，选择适当时间进行显微镜观察。

(2) 有时观察到的子囊孢子的排列为+++++——，++————，+++++——，——+++++，即为6:2或2:6的分离比和5:3或3:5的分离比。排除上面第(1)点说明的原因外，这样的情况的出现是由于基因转变造成的。基因转变的频率因基因位点不同而异，但一般在1%左右。

(3) 本实验用的赖氨酸缺陷型菌株为 Lys5，Lys5 基因座位于第六连锁群，着丝粒距离约为 14.8 图距单位。可供实验结果计算时参考。

实验十一 酵母菌杂交

一、实验原理

酵母菌的生活史属于双单性类型，它们的单倍体细胞和二倍体细胞一般都能进行无限制的分裂。以单倍体细胞为主的酵母菌称为单倍体酵母，例如粟酒裂殖酵母 (Schizosaccharomyces pombe)。以二倍体细胞为主的酵母菌称为二倍体酵母，如啤酒酵母 (又称面包酵母，Saccharomyces cerevisiae)。这两种酵母常用作遗传学研究的材料，而啤酒酵母在酿酒工业和食品工业中又有很大的应用价值。本实验用异宗配合型的啤酒酵母的单倍体菌株进行杂交实验。任何一株酵母菌，如果使二倍体的营养细胞处于形成孢子的条件下，都会发生减数分裂，生成四分体和子囊。每个子囊孢子具有四分子核，正常情况下子囊中有4个子囊孢子，其中有2个a和2个 α ，a和 α 表示两种相对的结合型。具有这两种结合型的子囊孢子萌发生长成单倍体的菌株，不同结合型的单倍体菌株细胞接合生成二倍体菌株。具有这样生活史的酵母菌称为异宗配合型酵母。异宗配合型啤酒酵母的生活史见图 11-1。

单倍体菌株分属a和 α 两种结合型，是受一对等位基因a和 α 控制的，这对等位基因的座位在第三连锁群靠近着丝粒的地方。在光学显微镜下观察酵

母的染色体是十分困难的，但借助于电子显微镜，对酵母菌的细胞学已了解得较多了。现已知啤酒酵母具有 17 个连锁群 ($n=17$)。

两个属于不同接合型的营养缺陷型的酵母单倍体菌株，在基本培养基上都不能形成菌落。当它们杂交形成二倍体杂种细胞，就能在基本培养基上生长。二倍体杂种细胞在形成子囊孢子过程中，发生染色体重组，而使产生的子囊孢子出现重组性状。

二、实验目的

通过酵母菌杂交实验了解异宗配合型啤酒酵母的生活史和基因自由组合定律，掌握酵母菌杂交的基本方法。

三、实验材料

1. 啤酒酵母单倍体腺嘌呤缺陷型 (ade^-)，接合型为 a；

2. 啤酒酵母单倍体组氨酸缺陷型 ($His1^-$)，接合型为 b。

四、实验器具和药品

1. 用具：试管，离心管，离心机，吸管，培养皿，三角烧瓶，涂布棒，石英砂。

2. 药品：生理盐水 (0.85 克 NaCl 溶于 100 毫升蒸馏水中，15 磅压力下消毒 15 分钟)，纤维素酶或蜗牛酶。

3. 培养基：

(1) 完全液体培养基：蛋白胨 2 克，酵母浸母汁 1 克，葡萄糖 2 克，水 100 毫升，pH6.0，8 磅压力下灭菌 30 分钟。

(2) 完全固体培养基：在完全液体培养基中加 2% 琼脂。

(3) 基本液体培养基：葡萄糖 10 克， $(NH_4)_2SO_4$ 1 克， K_2HPO_4 0.125 克， KH_2PO_4 0.875 克，KI^{*}母液 1 毫升， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200.5 克， $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 克，NaCl 0.1 克，微量元素母液^{**} 1 毫升，维生素母液^{***} 1 毫升，水 1000 毫升，pH5.3，8 磅压力下灭菌 30 分钟。

^{*}KI 母液：10 毫克 KI 于 100 毫升水中。

^{**}微量元素母液： H_3PO_4 1 毫克， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7 毫克， $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 毫克， $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 毫克，水 100 毫升。

^{***}维生素母液：烟碱酸 40 毫克，维生素 B₁ 40 毫克，肌醇 200 毫克，核黄素 20 毫克，对-氨基苯甲酸 20 毫克，吡哆醇 40 毫克，泛酸 40 毫克，生物素 0.2 毫克，水 100 毫升。

(4) 基本固体培养基：在基本液体培养基中加 2% 琼脂。

(5) 产孢子培养基： CH_3COONa 8.2 克，KCl 1.86 克，吡哆醇母液^{*} 1 毫升，泛酸母液^{**} 1 毫升，生物素母液^{***} 1 毫升，琼脂 20 克，蒸馏水 1000 毫升。

^{*}吡哆醇母液：20 毫克吡哆醇/100 毫升水。

^{**}泛酸母液：20 毫克泛酸/100 毫升。

^{***}生物素母液：2 毫克生物素/100 毫升。

(6) 补充培养基：

a. 基本固体培养基 100 毫升加组氨酸 3.5 毫克。

b. 基本固体培养基 100 毫升加腺嘌呤 3 毫克。

五、实验步骤

1. 取盛有完全固体培养基斜面的试管 4 支。把 ade^- 和 $His1^-$ 两菌种各接种在二支斜面上。30 ° 温箱中培养 24 小时。

2. 用 5 毫升生理盐水洗下一支 ade^- 斜面上的菌，再倒入另一支 ade^- 试管中，洗下的菌最后倒入无菌离心管中。另取 5 毫升生理盐水洗下 $His1^-$ 二支试管斜面的菌，倒入无菌离心管中。这样制成的菌液，浓度约 10^8 /毫升。

3. 两亲本菌液各吸 0.5 毫升，放入 5 毫升完全液体培养基中，30 ° 静止培养 2 小时。

4. 离心（3000 转/分，3 分钟），30 ° 静止培养半小时。

5. 倒去上清液，打匀管底菌块，再加入 6 毫升新鲜完全液体培养基，30 ° 培养过夜。

6. 离心，倒去上清液。再加 6 毫升新鲜完全液体培养基，洗一次，离心，倒去上清液。

7. 将离心管中的沉淀菌接种在产孢子培养基斜面上，30 ° 培养 2—3 天。在显微镜下观察杂交后形成的子囊，可见其中有 4 个子囊孢子。

8. 测定子囊孢子的表型推断其基因型：

(1) 在长有子囊的斜面上加基本培养液 2 毫升，用接种环将子囊刮下，倒入无菌离心管中。

(2) 在 55 °—60 ° 的恒温水浴中加热 15 分钟，杀死酵母菌的营养体，即单倍体细胞。离心，倒去上清液，加生理盐水到原体积，形成子囊悬液。

(3) 把孢子悬液倒入消毒过的盛有石英砂的三角烧瓶中，振荡 5 分钟，使子囊孢子散出，成为子囊孢子悬液。

(4) 取打散的子囊孢子悬液 0.1 毫升涂布在完全培养基培养皿上，30 ° 培养 48 小时。

(5) 影印培养：以上面的培养皿为原始培养皿，依次影印：a. 基本培养基；b. 腺嘌呤补充培养基；c. 组氨酸补充培养基；d. 完全培养基。30 ° 培养 48 小时。

(6) 生长谱鉴定：

a. 从原始培养皿上挑取各个已经初步鉴定的菌落，接种在完全培养基斜面上。同时接种在有 5ml 液体完全培养基的离心管中，30 ° 培养 48 小时。

b. 离心（3000 转/分，3 分钟。），倒去上清液，打匀沉淀，然后离心洗涤三次，最后加生理盐水至原体积。

c. 吸取菌液 0.1 毫升，移至灭过菌的空培养皿中。然后倒入融化后冷至 40 °—50 ° 的固体基本培养基，摇匀，待凝。各做 1 皿。

d. 在每一培养皿的皿底划分四格，两格放少量组氨酸结晶粉末，另两格放少量腺嘌呤的结晶粉末。然后放到 30 ° 温箱培养 48 小时。

e. 观察生长情况，营养缺陷型菌株会在所需物质的周围长出来。如需要两种物质，就只能在两种物质都扩散到的地方生长。

操作步骤见图 11-2。

9. 实验步骤说明：

(1) 步骤 3—6，是为了用营养丰富的培养基培养好的新鲜细胞，并使不同接合型的细胞充分接触，形成合子，为产生孢子创造条件。

(2) 步骤 7 中，由于酵母在产孢子培养基上不会增殖，所以要求接种足

够多的细胞，使杂交形成的子囊不至于过少。

(3) 步骤 8(3)，要从子囊中取得子囊孢子，也可用蜗牛酶充分处理子囊后，用超声波处理使子囊孢子充分分散。蜗牛酶处理温度为 30°—37°，15—30 分钟。没有蜗牛酶，用石英砂振荡，也能使子囊壳破碎，散出子囊孢子。

(4) 酵母菌是单细胞真菌，不形成菌丝，所以在步骤 8(5) 中可采用影印方法。

六、实验结果

1. 影印结果：能生长用“+”表示，不能生长用“-”表示，并计算菌落数。

	基本培养基	腺嘌呤补充培养基	组氨酸补充培养基	完全培养基	单倍体基因型
生长情况					
菌落数					

2. 生长谱鉴定：

皿号	添加 ade	添加 His1	单倍体的基因型
1			
2			
...			
...			

3. 影印与生长谱鉴定结果相比较，看结论是否一致。

4. 实验结果说明：

本实验用的啤酒酵母营养缺陷型单倍体菌株，有关的 ade 和 His1 基因属于不同的连锁群，是两对基因的自由组合。因此在实验结果中，单倍体基因型的比例应为 + + ade⁻ His1⁻ ade⁻His1⁻ = 1 1 1 1。单倍体菌株的表型比也应为 1 1 1 1。表型分离比直接反映了基因型的分离比。

实验十二大肠杆菌杂交

一、实验原理

Lederberg 和 Tatum (1946) 选用典型的大肠杆菌为材料，筛选营养缺陷型。利用双重和三重缺陷型的菌株，在简单的合成培养基上混合培养，在此培养基上只有重组子能长，亲本不能长，即所谓选择性培养，使细菌杂交获得成功。图 12-1 说明了细菌的基因重组是不同基因型的细菌经接触，接合后随之发生交换和杂种细菌分离的过程。

大肠杆菌的杂交试验中发现有些菌株经混合培养能得到重组子，有些却不能。1952 年 Hayes 做了一个实验，他所用的二个菌株是菌株 A 和菌株 B。菌株 A 是不能合成甲硫氨酸和生物素；菌株 B 是苏氨酸、亮氨酸和维生素 B₁ 的三重缺陷型。Hayes 首先筛选链霉素抗性突变型 AS^r 和 BS^r，然后在不含链霉素的基本培养基上进行正反杂交，结果没有不同，但在含链霉素的基本培

培养基上进行正反杂交，结果却不一样，在 $AS^S \times BS^r$ 杂交中能得到重组子，可是 $AS^r \times BS^S$ 杂交中却并不出现重组菌落。这一现象说明大肠杆菌中有不同的“性”，它与致育因子 F 有关。同时按细胞中有无 F 因子将大肠杆菌分为二类，有 F 因子的为 F^+ ，没有 F 因子为 F^- 。F 因子是一个小的 DNA 环状分子，分子量约 4.5×10^6 道尔顿。带有 F 因子的细胞，表面有一种称为性菌毛的毛状突起，长约 1 至 20μ 。性菌毛上有雄性专一噬菌体（MS₂、k17、f₂、Q 等）的吸附位点，又和细胞的接合有关。F 因子在细胞中能以二种状态存在；游离状态和整合到寄主染色体的一定位置。以致带有 F 因子的大肠杆菌可分为二类： F^+ 和 Hfr 菌株。经吡啶橙处理 F^+ 变为 F^- ，而 Hfr 性质不变，说明 F 因子在 F^+ 菌株中呈游离状态，而在 Hfr 菌株中则整合到寄主染色体的一定位置（图 12-2）。

大肠杆菌杂交在 F^+ 与 F^- 菌株之间进行，通过细胞的暂时沟通，形成局部合子。在部分合子的形成中，提供部分染色体或少数基因的菌称为供体菌，提供整个染色体的菌称为受体菌；所以 F^+ 和 Hfr 是供体细菌， F^- 是受体菌。 F^+ 和 F^- 能杂交，Hfr 和 F^- 也能杂交， F^- 和 F^- 则不能杂交；但这二个可杂交组合其特性不同，主要表现在：1. Hfr 细菌和 F^- 细菌杂交以后 F^- 细菌性质不变， F^+ 和 F^- 细菌杂交以后 F^- 细菌转变为 F^+ （约 70%）。2. F^+ 和 F^- 细菌杂交重组频率 10^{-6} ，Hfr 和 F^- 细菌杂交重组频率高出 F^+ 菌株几百倍，称高频重组。

在 F^+ 与 F^- 杂交中，F 因子由 F^+ 供体高频转移到 F^- 受体，低频转移宿主染色体的标志。原因是 F^+ 群体中每个细胞能转移性因子到 F^- 受体，只有小部分细胞能转移染色体的标记。在 Hfr 与 F^- 杂交中，Hfr 供体的染色体由原点（在 F 因子内）开始转移进入受体菌，在这过程中 F 因子被割裂，F 因子基因，一些是首先进入，另一些是最后进入。在这类杂交中只有当交配过程长到足以允许整个供体染色体被转移入 F^- 受体，受体细胞才能由 F^- 变为 Hfr。

杂交实验有多种不同方法，这里介绍的是直接混合培养和液体培养。直接混合培养法操作简单，适用于确定二个菌株间能否杂交或测定重组频率的高低，而液体培养适宜于细菌的基因定位。

二、实验材料

大肠杆菌（*Escherichiacoli*K12）的四个菌株： $K12Pro$ （ F^+ ）； $W1485HisIleF^+$ ； $W1177ThrLeuthixylGalaramtl$ $malacstr^r$ （ F^- ）； $HfrCMetTrp$ 。

Pro：脯氨酸，（ F^- ）：原噬菌体整合在染色体上，His：组氨酸，ilv：异亮氨酸缬氨酸，Thr：苏氨酸，Leu：亮氨酸，thi：维生素 B¹，xyl：木糖，Gal：半乳糖，ara：阿拉伯糖，mtl：甘露醇，mal：麦芽糖，lac：乳糖， str^r ：链霉素抗性，Met：甲硫氨酸，Trp：色氨酸。

三、实验器具和药品

1. 用具：灭菌培养皿（9 厘米），灭菌三角瓶（150 毫升），灭菌吸管（1、5、10 毫升），灭菌离心管，灭菌空试管。

2. 培养基：

（1）基本培养基 Vogel50 × *： $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 克，柠檬酸 100 克，

$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 175 克, K_2HPO_4 500 克 ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 644 克), 蒸馏水约 1,000 毫升** (配好后放入冰箱保存备用)。

(2) 平板用基本培养基: Vogel 50 × 2 毫升, 葡萄糖 2 克, 琼脂 2 克***, 蒸馏水 98 毫升, pH7.0, 高压灭菌 8 磅/英寸² 30 分钟。

(3) 液体完全培养基(肉汤培养基): 牛肉膏 0.5 克, 蛋白胨 1 克, NaCl 0.5 克, 蒸馏水 100 毫升, pH7.2, 高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

(4) 半固体培养基: 琼脂 0.7—1 克, 蒸馏水 100 毫升, pH7.0, 高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

四、实验说明

大肠杆菌中除了不同型细胞的接合外, 同型细胞 F^+ 与 F^+ 或 F^+ 即浓度为使用浓度的 50 倍。

** 将称好的药品分别溶解于 670 毫升蒸馏水中, 待一种药品溶解后再放另一种药品, 直至全部药品都溶解, 然后加水定容到 1,000 毫升。

*** 琼脂的添加量由 1.5—2 克, 根据琼脂的质量而定。凝固性能好的琼脂, 可少加一些, 反之, 则要多加一些。Hfr 与 Hfr 也能接合, 但重组频率很低。细胞中的 F 因子使细胞壁的抗原发生了变化, 这些不同于 F 性菌毛的表面成分阻止了 F^+ 与 F^+ 细胞杂交。经培养后处于饥饿条件下的 F^+ 细胞丧失了它们的表面排斥性, 才能与其它 F^+ 细胞接合(这种改变是暂时的, 一旦在新鲜培养基中, 继续生长正常的表面特性又恢复), 这些表型上的“ F^- 细胞”称为拟表型。在抑制新的 F 性菌毛和表面成分形成的条件下生长, 如低温下连续通气培养 24—48 小时, 能增加拟表型的百分数。

1946 年 Lederberg 和 Tatum 开始发现细菌的接合以后, 普遍认为 DNA 的转移必需 F^+ (Hfr) 与 F^- 细胞的紧密接触。Anderson 等于 1957 年根据电镜照片指出接合细胞之间形成了桥。之后发现 F^+ (Hfr) 和性菌毛之间的关系, 认为细菌染色体和专一雄性噬菌体通过性菌毛而转移。近来的电镜照片已经发现接合细胞通过性菌毛接触, 并有实验依据。细胞接合后, 供体中的 DNA 开始合成。一个单链 DNA 转移入受体并合成一条新的互补链; 这个过程能以 DNA 复制的滚环模型来说明。

上面提到带有 F 因子的大肠杆菌有 F^+ 和 Hfr 二类, 实际上并不是所有的 Hfr 全是相当稳定的, 在许多 Hfr 群体中含有回复子, 在这些回复子中 F 因子不再整合在染色体上, 而回复到游离状态, 当 F 因子脱离寄主染色体时携带了细菌的基因, 例如 lac 和 gal 等, 这称之为 F 因子。带有 F 因子的菌称为 F 菌株。F 菌株也能与 F^- 杂交, 现被广泛应用于细菌的研究工作。

五、实验步骤

1. 菌液制备:

(1) 实验前 14—16 小时, 从冰箱保存的斜面菌种, 挑少量菌于盛有 5 毫升完全液体培养基的三角烧瓶中; 每一个菌株接种一瓶, 共接种 4 瓶, 置 37 培养过夜。

(2) 取出培养过夜的细菌, 在 W1177 一瓶菌液中加入 5 毫升新鲜的完全培养液, 充分摇匀, 等量分成 2 瓶; 其余 3 瓶菌液分别用灭菌的 5 毫升吸管, 各吸出 2.5 毫升菌液, 然后再各加入 2.5 毫升新鲜的完全培养液, 充分摇匀, 各菌于 37 继续培养 3—5 小时。

(3) 自温箱取出三角烧瓶，分别倒入离心管，菌株 W1177 倒二支离心管，其余菌株各倒入一支离心管，离心沉淀，3,500 转/分，离心 10 分钟。

(4) 倒去上清液，打匀沉淀，加入无菌水，离心洗涤 3 次，再加无菌水到原体积。

2. 杂交——混合培养：

(1) 取 12 支灭菌试管，每支吸入 3 毫升经融化的半固体培养基，并保温在 45℃（保温温度不宜高，北方气温低，可降低半固体中的琼脂量）。

(2) 12 支试管分成三个杂交组合，即 W1177 × K12pro；W1177 × W1485；W1177 × HfrC。每个组合各 4 支试管，其中 2 支对照，2 支混合菌液。

(3) 对照组试管各吸 F⁺或 Hfr 供体菌菌液 1 毫升，其余按杂交组合各吸供体菌和受体菌菌液 0.5 毫升，充分混匀。

(4) 将各试管中含菌的半固体倒在有 Vogel 培养基底层的平板上，摇匀待凝，放 37℃ 培养，48 小时后观察（图 12-3）。

六、实验结果记录

实验十三大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选

一、实验原理

在以微生物为材料的遗传学研究中，用某些物理因素或化学因素处理细菌，使基因发生突变，丧失合成某一物质（如氨基酸、维生素、核苷酸等）的能力，因而它们不能在基本培养基上生长，必须补充某些物质才能生长。这样从野生型经诱变筛选得到的菌株，称为营养缺陷型。筛选营养缺陷型菌株必须经过以下几个步骤：诱变处理、淘汰野生型、检出缺陷型、鉴定缺陷型。由于本实验是以大肠杆菌为材料，所以根据细菌的特性分别说明筛选的步骤。

诱变剂的作用主要是提高突变频率，它分为物理和化学的二类。物理诱变剂常用的有 X 射线、紫外线、快中子、 γ 射线等诱变处理首先是选择诱变剂，微生物诱变中最常用的物理诱变剂是紫外线。

诱变剂所处理的微生物，一般要求呈单核的单细胞或单孢子的悬浮液，分布均匀，这样可以避免出现不纯的菌落。用于诱变处理的微生物一般处于对数生长期，那时的细菌对诱变剂的反应最灵敏。

诱变处理必须选择合适的剂量，剂量的表示有二种，绝对剂量和相对剂量。绝对剂量的单位以尔格/cm² 表示，一般用相对剂量。相对剂量与三个因素有关，这三个因素是：诱变源和处理微生物的距离，诱变源（紫外灯）的功率，以及处理的时间。前二个因素是固定的，所以通过处理时间控制诱变剂量。各种微生物的处理最适剂量是不同的，须经预备实验确定。

经处理以后的细菌，缺陷型还是相当少的，必须设法淘汰野生型细胞，提高营养缺陷型细胞所占比例，以达到浓缩缺陷型的目的。细菌中常用的浓缩法是青霉素法。青霉素是杀菌剂，它只杀死生长的细胞，对不生长的细胞没有致死作用。所以在含有青霉素的基本培养基中野生型能长而被杀死，缺陷型不能长被保存得以浓缩。

检出缺陷型的方法有逐个测定法、夹层培养法、限量补给法、影印培养法。这里主要以逐个测定法为例进行说明。把经过浓缩的缺陷型菌液接种在完全培养基上，待长出菌落后将每一菌落分别接种在基本培养基和完全培养基

上。凡是在基本培养基上不能生长而在完全培养基上能长的菌落就是营养缺陷型。

经初步确定为营养缺陷型的菌用生长谱法鉴定。在同一培养皿上测定一个缺陷型对多种化合物的需要情况。

二、实验材料

大肠杆菌 K12 的野生型菌株大肠杆菌 (Escherichiacoli) K12SF⁺。

三、实验器具和药品

1.用具：灭菌培养皿（9 厘米），灭菌三角烧瓶（150 毫升），灭菌吸管（1.5 毫升），灭菌离心管。

2.培养基：

（1）肉汤液体培养基：牛肉膏 0.5 克，蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.2，高压灭菌 15 磅/英寸²15 分钟。

（2）肉汤液体培养基（ZE）：牛肉膏 0.5 克，蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，蒸馏水 50 毫升，pH7.2，高压灭菌 15 磅/英寸²15 分钟。

（3）基本液体培养基：Vogel 50 × 2 毫升，葡萄糖 2 克，蒸馏水 98 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅/英寸²30 分钟。

（4）基本固体培养基：琼脂 2 克，基本液体培养基 100 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅/英寸²30 分钟。

（5）无 N 基本液体培养基：K₂HPO₄ 0.7 克（或 K₂HPO₄ · 3H₂O 0.92 克），KH₂PO₄ 0.3 克，柠檬酸钠 · 3H₂O 0.5 克，MgSO₄ · 7H₂O 0.01 克，葡萄糖 2 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅/英寸²30 分钟。

（6）2N 基本液体培养基*：K₂HPO₄ 0.7 克（或 K₂HPO₄ · 3H₂O 0.92 克），KH₂PO₄ 0.3 克，柠檬酸钠 · 3H₂O 0.5 克，MgSO₄ · 7H₂O 0.01 克，(NH₄)₂SO₄ 0.2 克，葡萄糖 2 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅/英寸²30 分钟。

（7）混合氨基酸和混合维生素及核苷酸的配制：氨基酸（包括核苷酸）分 7 组（I—VII），其中 6 组（I—VI）每组有 6 种氨基酸（包括核苷酸），每种氨基酸（包括核苷酸）等量研细充分混合。第 7 组是脯氨酸，因为这种氨基酸容易潮解，所以单独成一组。

I.	赖	精	甲硫	半胱	胱	嘌呤
.	组	精	苏	羟脯	甘	嘧啶
.	丙	甲硫	苏	羟脯	甘	丝
IV.	亮	半胱	谷	羟脯	异亮	缬
V.	苯丙	胱	天冬	甘	异亮	酪
VI.	色	嘌呤	嘧啶	丝	缬	酪
.	脯					

把维生素 B₁、B₂、B₆，泛酸，对氨基苯甲酸（BAPA），烟碱酸及生物素等量研细，充分混合，配成混合维生素。

3.生理盐水：NaCl 0.85 克，蒸馏水 100 毫升，高压灭菌 15 磅/英寸²15 分钟*。

四、实验说明

微生物中筛选营养缺陷型的步骤包括诱变处理、淘汰野生型、检出缺陷型、鉴定缺陷型四步。由于不同微生物和诱变剂的特性差异，所以在实际工作中，应根据具体情况而适当变动，现分别补充说明。

当选用化学诱变剂进行诱变处理时，首先应根据诱变剂的特性，确定用何种诱变剂。化学诱变剂根据它们的诱变作用可以区分为三种：1. 通过掺入 DNA 分子而引起突变，必须通过代谢作用。属于这一类的诱变物质如碱基类似物。2. 通过和 DNA 直接起化学反应而引起突变。多数化学诱变剂属于这一类如亚硝酸等。3. 通过一对核苷酸的插入或缺失而引起突变如吡啶类物质。

化学诱变剂的剂量也以相对剂量表示。相对剂量与三个因素有关：诱变剂浓度，处理温度和处理时间。一般通过处理时间来控制剂量。处理前诱变剂和菌液分别预热，以便当二者混合后即可计算处理时间，才能精确控制剂量。处理时间应按不同的处理菌而有所区别，最适剂量应事先进行预备试验确定。

浓缩缺陷型的方法有青霉素法、菌丝过滤法，差别杀菌法、饥饿法等，这些方法适用于不同的微生物。细菌应用青霉素浓缩法，酵母菌和霉菌的缺陷型筛选可以用制霉菌素代替青霉素。放线菌和霉菌可用菌丝过滤法，它们的野生型孢子能在基本培养液中萌发并长成菌丝，缺陷型的孢子不能长成菌丝。所以把经诱变处理的孢子悬浮在基本培养液中振荡培养，在培养过程中过滤几次，每次培养时间不宜过长，这样才能充分浓缩。

*高渗青霉素法在 2N 基本培养液中加 20%蔗糖和 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。

营养缺陷型的检出方法有逐个测定法、夹层培养法、限量补给法、影印培养法等。现简述如下：夹层培养法，先在皿底倒一层不含细菌的基本培养基，待凝后加上一层含菌的基本培养基，冷凝后再加上一层不含菌的基本培养基。经培养出现菌落以后在培养皿底上把菌落做上标记，然后加上一层完全培养基，再经培养以后出现的菌落多数是营养缺陷型。影印培养法，将经处理的细菌涂在完全培养基的表面，待出现菌落以后，用灭菌丝绒将菌落影印接种到基本培养基表面。待菌落出现以后比较两个培养皿，凡在完全培养基上出现菌落而在基本培养基上的同一位置上不出现菌落者，这一菌落便可以初步断定是一个缺陷型。

五、实验步骤

1. 菌液制备：

(1) 实验前 14—16 小时，挑取少量 K12SF⁺菌，接种于盛有 5 毫升肉汤培养液的三角瓶中，置 37℃ 培养过夜。

(2) 第二天添加 5 毫升新鲜的肉汤培养液，充分混匀后，分装 2 只三角瓶，继续培养 5 小时。

(3) 将两只三角瓶的菌液分别倒入离心管中，离心 (3, 500 转/分) 10 分钟。

(4) 倒去上清液，打匀沉淀。其中一管吸入 5 毫升生理盐水，然后倒入另一离心管，二管并成一管。

2. 诱变处理：

(1) 吸上述菌液 3 毫升于培养皿内，将培养皿放在 15W 的紫外灯下。距离 28.5 厘米。

(2) 处理前先开紫外灯稳定 30 分钟，将待处理的培养皿连盖放在灯下灭

菌 1 分钟，然后开盖处理 1 分钟。照射毕先盖上皿盖，再关紫外灯。

(3) 吸 3 毫升加倍肉汤培养液到上述处理后的培养皿中。置 37 温箱内，避光培养 12 小时以上。

3. 青霉素法淘汰野生型：

(1) 吸 5 毫升处理过的菌液于已灭菌的离心管，离心 (3,500 转/分) 10 分钟。

(2) 倒去上清液，打匀沉淀，加入生理盐水，离心洗涤三次，加生理盐水到原体积。

(3) 吸取经离心洗涤的菌液 0.1 毫升于 5 毫升无 N 基本培养液，37 培养 12 小时。

(4) 培养 12 小时后，按 1:1 加入 2N 基本培养液 5 毫升，称取青霉素钠盐，使青霉素在菌液中的最终浓度约为 1.000 单位/毫升，再放入 37 温箱中培养。

(5) 先从培养 12、16、24 小时的菌液中各取 0.1 毫升菌液倒在两个灭菌培养皿中，再分别倒入经融化并冷却到 40 - 50 的基本及完全培养基，摇匀放平，待凝固后，放入 37 温箱中培养 (培养皿上注明取样时间)。

4. 缺陷型的检出：

(1) 以上平板培养 36—48 小时后，进行菌落计数。选用完全培养基上长出的菌落数大大超过基本培养基的那一组，用接种针挑取完全培养基上长出的菌落 80 个，分别点种于基本培养基与完全培养基平板上，先基本后完全，依次点种，放 37 温箱培养。

(2) 培养 12 小时后，选在基本培养基上不生长、而在完全培养基上生长的菌落，再在基本培养基的平板上划线，37 温箱培养，24 小时后不生长的可能是营养缺陷型。

5. 生长谱鉴定：

(1) 将可能是缺陷型的菌落接种于盛有 5 毫升肉汤培养液的离心管中，37 培养 14—16 小时。(2) 培养 16 小时后，离心 (3500 转/分) 10 分钟，倒去上清液，打匀沉淀，然后离心洗涤三次，最后加生理盐水到原体积。

(3) 吸取经离心洗涤的菌液 1 毫升于一灭菌的培养皿中，然后倒入融化后冷却至 40—50 的基本培养基，摇匀放平，待凝，共做两皿。

(4) 将 2 只培养皿的皿底等分 8 格，依次放入混合氨基酸 (包括核苷酸)，混合维生素和脯氨酸 (加量要很少，否则会抑制菌的生长)，然后放 37 温箱培养 24—48 小时，观察生长圈，并确定是哪种营养缺陷型 (见图 13-1)。

六、实验结果记录

1. 诱变处理的记录：

培养基	菌落数		
	12 小时	16 小时	24 小时
[+]			
[-]			

2. 生长谱鉴定的记录：

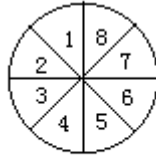


图13-2 生长谱鉴定用
培养皿底部图示

你所鉴定的缺陷型是哪种缺陷型，生长圈在哪个区。

实验十四啤酒酵母菌营养缺陷型菌株的筛选

一、实验原理

利用化学诱变剂诱发突变是遗传学研究和育种工作的常用手段。

化学诱变剂按其诱变机理一般可分为三类：（1）通过掺入 DNA 分子引起突变，（2）通过和 DNA 直接起化学反应后引起突变，（3）通过一对核苷酸的插入或缺失引起突变。本实验以烷化剂亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)为诱变源，它的诱变机理属于第二类。现在一般认为烷化剂的诱变机理主要是由于对鸟嘌呤 N-7 位置上的烷化作用（鸟嘌呤其它位置以及其它碱基的许多位置也可能被烷化），然后被烷化的碱基同碱基结构类似物作用机制一样，通过 DNA 复制，引起碱基错误配对导致碱基转换或颠换造成基因突变。通常烷化后的碱基（G）偶然与胸腺嘧啶（T）错误配对代替胞嘧啶（C）。

NTG 主要诱发 GC—AT 的转换。它除有较强的诱变作用外，还能诱发邻近位置基因的并发突变，而且特别容易诱发 DNA 复制叉附近的基因突变，随着复制叉的移动，它的作用位置也随着移动。

NTG 是一种超诱变剂，它的诱发效率可使百分之几十的细菌发生营养缺陷型突变，因此经 NTG 处理的细菌不必经过青霉素浓缩处理，而只要通过适当的筛选方法就能检出营养缺陷型。一般讲，一种高效率的诱变剂，只要有一种有效的筛选方法是可以获得任何突变型的。

诱变处理所用的细胞一般为对数期细胞。化学诱变剂的剂量一般以药物浓度表示。一定的剂量有一定的杀菌率和诱变率，通过杀菌率和诱变率可帮助我们了解一定剂量的诱变作用。诱变作用往往与药物处理时间和温度有关。具有较强诱变作用，较弱杀菌作用的诱变剂（如烷化剂）可采用较低剂量（约 50% 的杀菌率），反之，紫外线一般采用较高杀菌作用的剂量（如 90%—99.9% 杀菌率）。

二、实验材料

1. 啤酒酵母菌单倍体 26 - 4（来自上海酵母厂）。
2. 啤酒酵母菌单倍体 143—2（来自上海酵母厂）。

三、实验器具和药品

1. 用具：培养皿（9 厘米），三角瓶（150 毫升），试管，离心管，吸管（1 毫升、5 毫升），玻璃涂棒，玻璃珠，丝绒布，圆木柱。

2. 培养基

（1）基本培养基：葡萄糖 10 克， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克， KH_2PO_4 0.876 克， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 克， K_2HPO_4 0.125 克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克， NaCl 0.1 克，KI 母液 1 毫升，微量元素母液 1 毫升，维生素母液 1 毫升，蒸馏水加到 1000 毫升。高压灭菌 8 磅 25 分钟。

注：碘化钾母液：1 克/毫升。

微量元素母液：H₃B₃O₃ (硼酸) 1 毫克/100 毫升、ZnSO₄ · 7H₂O (硫酸锌) 7 毫克/100 毫升、CuSO₄ · 5H₂O (硫酸铜) 1 毫克/100 毫升、CoCl₂ · 6H₂O (氯化钴) 5 毫克/100 毫升。

维生素母液：维生素 B₁ 40 毫克/100 毫升、烟碱酸 40 毫克/100 毫升、肌醇 200 毫克/100 毫升、核黄素 20 毫克/100 毫升、对-氨基甲酸 20 毫克/100 毫升、吡哆醇 40 毫克/100 毫升、泛酸 20 毫克/100 毫升、生物素 3 毫克/100 毫升。以上三种母液都需高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(2) 基本固体培养基：在上述培养基加 2% 琼脂即可。

(3) 完全液体培养基：蛋白胨 20 克、酵母浸出汁 10 克、葡萄糖 20 克、蒸馏水 1000 毫升，pH6.0，高压灭菌 8 磅 25 分钟。

(4) 完全固体培养基：在上述培养基加 2% 琼脂即可。

(5) 无菌水

(6) 生理盐水 (0.85%)

(7) 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0)：0.2mol/LNa₂HPO₄ 12.3 毫升、0.2mol/LNaH₂PO₄ 87.7 毫升。

3. 诱变剂：亚硝基胍 (NTG)。

四、实验说明

1. 本实验采用的诱变剂是一种超诱变剂，因此安全操作十分重要。称量时，最好在某一固定地方，戴好橡皮手套和口罩在密闭箱里进行，以防止 NTG 颗粒吹散。操作时，不能用嘴直接吸取含有 NTG 的液体，应改用洗耳球吸取。凡含有 NTG 的器皿和用具都要用浓碱处理。

2. 利用酵母菌进行诱变工作，首先要获得单倍体菌株。在二倍体细胞中，隐性性状 (突变往往是隐性) 不能表现。而单倍体细胞，隐性突变性状就能直接表现。因此，获得单倍体细胞对诱变工作来说是重要的。

一个简单的办法是：利用营养细胞和子囊孢子的耐热性差异进行热处理，就能很容易得到单倍体细胞。具体做法是把二倍体营养细胞接种于产孢子培养基的斜面上，用 5 毫升无菌水制成悬浊液，将此悬浊液浸于 55—60 恒温水浴中，不断振荡处理约 10 分钟 (处理时间，根据对营养细胞耐热性预备试验而定。一般以约 10⁶—10⁷ 的营养细胞菌悬液经一定时间处理后，用接种环挑取一环菌液接种于完全平板或斜面，30 培养 2 天后，看完全不生长或只有一两个菌落生长为标准作为所需的处理时间)。处理后，用自来水迅速冷却，适当稀释涂布于完全培养基平板，30 培养 2 天后，用接种环挑取较小的圆锥形菌落镜检，从形态上判断单倍体细胞。用这方法，一般要划线纯化后较为可靠。为了进一步提高可靠性，可接种于产孢子培养基上看是否产孢子来确定。如先用一定浓度的纤维素酶处理，再进行热处理可提高获得单倍体细胞的效率。

五、实验步骤

1. 制备菌悬液

(1) 将酵母菌单倍体菌株 #26—4 (或 143—2) 从保存斜面上，用接种环挑一些菌，接种到盛有 5 毫升完全液体培养液的灭菌离心管中，28—30 培养 16—18 小时，共接 2 支。

(2) 将培养过的菌液倒入盛有玻璃珠的灭菌三角瓶中，振荡 10 分钟，使酵母菌充分均匀分散。

(3) 将上述菌液各吸 4 毫升于 2 支灭菌离心管中离心 (3500 转/分, 10 分钟), 倒去上清液, 打匀菌块, 各加 4ml 无菌水制成菌悬液, 并存放在 30 水浴中备用。

2. 活菌计算 (用没有经 NTG 处理的菌液作对照)

(1) 从 30 水浴中取出一支菌悬液 (4 毫升), 加生理盐水 1 毫升, 然后再用生理盐水稀释到 10^{-4} 、 10^{-5} 。

(2) 从 10^{-4} 或 10^{-5} 稀释液中吸取 0.1 和 0.5 毫升于灭菌培养皿中, 各做二皿, 共四皿。

(3) 将融化不烫手的完全固体培养基倒入上述含菌的培养皿中 (每皿约倒入培养基 15—20 毫升), 摇匀、放平待凝, 30 培养二天, 计算活菌数。

3. 诱变处理

(1) 称取 NTG 1.5 毫克于灭菌的离心管中, 然后加入 1 毫升 pH6.00.2mol/L 磷酸缓冲液, 使其完全溶解, 并存放在 30 水浴中备用。

(2) 从 30 水浴中取出另一支菌悬液 (4 毫升), 倒入上述含有 NTG 的离心管中 (此时 NTG 最终浓度为 300 /毫升), 充分混匀, 立刻放入 30 水浴中, 同时计算时间, 30 分钟后取出, 立即离心 (3500 转/分), 将上述废液倒入浓 NaOH 溶液中, 打匀菌块, 加 5 毫升生理盐水, 再离心 (3500 转/分) 一次, 倒去废液, 加 5 毫升无菌水制成菌悬液。

(3) 将融化不烫手的完全培养基倒入灭菌培养皿中 (每皿 15—20 毫升), 放平待凝, 共 20 皿。

(4) 将经 NTG 处理过的菌液稀释为 10^{-3} (希望每只培养皿中长 50—100 个菌落), 吸取 0.1 毫升和 0.05 毫升于上述预先倒好的培养皿中, 各倒 10 个皿。

(5) 用灭过菌的 Y 形玻璃涂棒将菌液涂匀, 30 培养 3—4 天, 计算活菌数。

(6) 计算杀菌率及存活率 (从诱变组中选择不污染、菌落分布均匀、菌数适中的培养皿留作下步影印备用)。

4. 影印

(1) 准备好影印用丝绒布 (高压灭菌, 干燥箱内烘干备用)。

(2) 将一定数量的母平板和预先准备好的基本培养基及完全培养基平板, 以一个母平板, 一个基本平板, 一个完全平板作为一组, 每组编号, 并在每个平板的底部用玻璃铅笔划上箭头作为标记。

(3) 将灭菌的丝绒布放在圆本柱上, 用橡皮筋扣住 (注意绒面不能用手摸), 先取母平板倒复在绒面上, 然后用铅笔轻轻在皿底上均匀地敲几下, 取下母平板 (放冰箱保存起来), 立即把 MM 平板 (基本培养基平板) 按箭头标记的相同方向复印上去 (方法同上), 取下 MM 平板, 再把 CM 平板 (完全培养基平板) 也按上述同样方法复印, 印毕, 30 培养 2—3 天。影印见图 14 - 1。

5. 点种复证

(1) 将每组复印的平板按箭头标记的同一方向进行比较, 找出 CM 平板上生长而 MM 平板上不生长的相应菌落, 用玻璃铅笔在相应位置的母平板上作上记号, 并编号, 以便进一步复证。

(2) 准备 MM 平板和 CM 平板, 平板数量可根据编号菌落多少而定, 一个

皿可划 36 个格子左右。

(3) 用灭菌牙签从母平板上挑取已编号的单菌落，按顺序在 MM 和 CM 平板上的相应位置上点种，点毕，30℃ 培养 2—3 天左右。

(4) 从温箱中取出培养皿，用接种环挑取确实只能在 CM 上生长而 MM 上不生长的单菌落接种于 CM 斜面，30℃ 培养 2 天

后放冰箱保存，供生长谱鉴定用。

6. 生长谱鉴定方法与微生物大肠杆菌诱变营养缺陷型的鉴定方法相同，所以从略。

六、实验结果

处 理	皿数	稀释	取样	活菌总数		存活菌数		突变型数		杀菌率	诱变率
				菌数/ 皿	菌数/ 毫升	菌数/ 皿	菌数/ 毫升	菌数/ 皿	菌数/ 毫升		
对 照	4	10 ⁻⁴ 或 10 ⁻⁵	0.5								
			0.1								
			0.5								
			0.1								
NTG (300 毫升 30 30 分钟)	20	10 ⁻³	0.05								
			0.1								

$$\text{杀菌率} : \left(1 - \frac{\text{存活菌数}}{\text{活菌总数}} \right) \times 100\%$$

$$\text{诱变率} : \frac{\text{突变型数} / \text{毫升}}{\text{活菌总数} / \text{毫升}} \times 100\%$$

实验十五细菌转导 (局限性转导)

一、实验原理

随着分子遗传学的发展，转导已成为遗传学分析的常用方法。所谓转导就是利用噬菌体为媒介将一个细胞 (供体) 的遗传物质传递给另一个细胞 (受体) 的过程。转导可分为二类：(1) 普遍性转导；(2) 局限性转导 (专一性转导)。本实验以局限性转导为例，用噬菌体专一性转导半乳糖发酵基因的现象来说明转导的基本原理，并初步掌握转导实验的基本技术。实验中所采用的供体菌株是 *E. coli* K₁₂ () gal⁺。当此细菌受紫外线诱导后，原噬菌体被释放出来，其中有一定比例的噬菌体带有邻近的半乳糖发酵基因，我们称这种噬菌体为转导噬菌体 (即 dggal⁺)。当转导噬菌体 (dggal⁺) 感染受体菌 *E. coli* K₁₂ gal⁻ 时，少部分 (约三分之一) 形成稳定的转导子，大部分 (约三分之二) 以杂基因子的形式形成不稳定的转导子。整个转导过程见图 15-1。

二、实验材料

1. *E. coli* K₁₂ () gal⁺ (大肠杆菌 K₁₂ 带有整合在半乳糖基因旁的原噬菌体溶源菌)

E.coli K12 Sgal⁻ (大肠杆菌 K12 染色体上半乳糖基因缺陷)

三、实验器具和药品

1.用具：培养皿(9厘米)，三角瓶(150毫升)，试管(15×1.5)，离心管，吸管(1毫升、5毫升、10毫升)，玻璃涂棒。

2.培养基

(1)肉汤液体培养基：牛肉膏5克，蛋白胨10克，NaCl5克，蒸馏水1000毫升，pH7.0-7.2，高压灭菌15磅15分钟。

(2)加倍肉汤液体培养基(2E)：牛肉膏0.5克，蛋白胨1克，NaCl0.5克，蒸馏水50毫升，pH7.0—7.2，高压灭菌15磅15分钟。

(3)肉汤半固体培养基：肉汤液体培养基中加1%的琼脂。

(4)肉汤固体培养基：肉汤液体培养基中加2%的琼脂。

(5)半乳糖 EMB 培养基：伊红 Y0.4 克，美蓝 0.06 克，半乳糖 10 克，多胨 10 克，K₂HPO₄2 克，琼脂 20 克，蒸馏水 1000 毫升，pH7.0—7.2，高压灭菌 8 磅 25 分钟。

(6) Vogel 150 × 基本培养基 (浓缩 50 倍的基本培养基)：MgSO₄ · 7H₂O 10 克，柠檬酸 100 克，NaNH₄HPO₄ · 4H₂O 175 克

K₂HPO₄ 500 克，蒸馏水定容 1000 毫升 (配好后放冰箱备用)。

(7) 半乳糖基本固体培养基：Vogal 150 × 2 毫升，半乳糖 2 克，优质琼脂粉 1.8 克，蒸馏水 98 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅 25 分钟。

(8) 磷酸缓冲液：KH₂PO₄ 2 克，K₂HPO₄ 7 克，MgSO₄ · 7H₂O 0.25 克，蒸馏水 1000 毫升，高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(9) 生理盐水：NaCl 8.5 克，蒸馏水 1000 毫升，高压灭菌 15 磅 15 分钟。

(10) 药品：氯仿。

四、实验说明

1. 局限性转导可分为低频转导 (LFT) 和 高频转导 (HFT)。从低频转导的转导子中可分离得到用于高频转导的双重溶源化细菌，以双重溶源菌诱导制得噬菌体裂解液进行转导试验就称其为高频转导。

在低频转导中，用于转导的噬菌体大部分属正常的噬菌体 (+)，只有少数属部分缺失的转导噬菌体 (dggal⁺)。当大量噬菌体感染受体菌时，大部分受体菌被正常的噬菌体感染裂解死亡。尽管少部分被转导噬菌体感染，由于大量正常噬菌体的存在，往往同时也被正常噬菌体感染裂解死亡，一般认为：只有部分同时感染的细胞，首先 + 通过正常的附着位点整合到受体菌染色体上，然后， dggal⁺ 的杂合附着位点和染色体上的杂合附着位点 (由于 + 整合造成) 再次整合形成不稳定杂因子 (双重溶源化细菌) 整个过程见图 15-2：

低频转导的转导频率较低，一般在 10⁶ 的感染细胞中有一个转导子出现。如改用双重溶源菌株进行诱导制备裂解液进行转导，情形就不同。由于 + 的存在使得 dg 同时成熟，裂解液中就会出现 50% 正常噬菌体和 50% 部分缺失的 dggal⁺ 转导噬菌体，因此可以得到约 50% 的转导子，从而大大提高了转导频率。

2. 溶源菌株的获得可通过较为简单的办法得到：用较高浓度的裂解液和用于转导的供体菌混合涂布于完全固体平板，同时做噬菌体和供体菌的

对照。37℃ 培养过夜后，第二天就能看到混合涂布的平板出现单菌落，而对照涂布噬菌体平板无菌落、涂布供体菌平板呈现一片菌落。单菌落的出现是由于大量噬菌体把被感染的菌大都裂解掉，而只有少部分对噬菌体抗性菌落和溶源菌才能生长。只要区分这二种菌落，就能获得所需要的溶源菌株。一个简单的办法是把各个单菌落接种于一定体积的完全培养液中，37℃ 培养一定时间，然后离心除去上清液，用完全培养液制成菌悬液（菌液可浓一些，也可加入一定量的 0.1mol/LCaCl_2 ），各挑取一环菌液滴加于涂有菌液（对噬菌体敏感的指示菌）的完全固体平板上，然后以一定距离的 U、V 照射，37℃ 培养过夜，第二天观察是否有噬菌斑出现，如果噬菌斑出现，表明相应的单菌落是溶源菌，反之是噬菌体抗性菌。

同样，对低频转导的转导子进行上述的实验就能分离到高频转导的双重溶源菌，因为双重溶源的转导子经 U、V 照射也将会释放噬菌体感染敏感细菌而产生噬菌斑，相反，其它转导子经 U、V 照射不释放噬菌体不形成噬菌斑，这样我们将容易区分这种状态的转导子，而获得我们所需要的双重溶源性菌株。

五、实验步骤

1. 噬菌体裂解液的制备

(1) 前一夜挑取一环供体菌 ($K_{12}(\text{ } gal^+)$) 接种于含有 5 毫升肉汤培养液的试管中，37℃ 培养过夜，然后吸取 0.5 毫升菌液于含有 4.5 毫升肉汤培养液的三角瓶中，继续培养 3—4 小时。

(2) 将三角瓶的菌液倒入离心管，3500 转/分离心 10 分钟。

(3) 除去上清液，加 4 毫升磷酸缓冲液，制备菌悬液。

(4) 取菌悬液 3 毫升于灭菌培养皿中，经 U、V (15W、距离 40 厘米) 处理，诱导 10 分钟。

(5) 处理后加入 3 毫升 2E 肉汤培养液，37℃ 避光培养 3 - 5 小时。

(6) 吸取培养液于灭菌离心管中，3500 转/分离心 10 分钟，然后小心吸取上清液于另一支塞有软木塞的灭菌离心管中，加入 0.2 毫升氯仿 (4—5 滴)，剧烈振荡半分钟，静止 5 分钟，小心把上清液用无菌吸管移入另一支灭菌试管 (即噬菌体裂解液)，供效价测定和转导用。

2. 噬菌体的效价测定 (噬菌体总数/毫升)

(1) 前一夜挑取一环受体菌 ($K_{12}gal^-$) 接种于含有 5 毫升肉汤培养液的试管中，37℃ 培养过夜。

(2) 吸取 0.5 毫升培养液于含有 0.25 毫升 0.1mol/LCaCl_2 的 4.5 毫升肉汤培养液的三角瓶中，继续培养 3—4 小时。

(3) 取已经融化并于 45℃ 保温的半固体琼脂试管 (每管 3 毫升) 4 支，每支试管加入上述经活化后菌液 0.5 毫升。

(4) 吸取噬菌体裂解液 0.5 毫升于含有 4.5 毫升肉汤培养液的试管中，依次稀释到 10^{-6} 与 10^{-7} 。

(5) 从 10^{-6} 和 10^{-7} 试管中分别吸取 0.5 毫升于上述已加有菌的半固体试管中 (每个稀释度 2 支)，搓匀、分别倒入预先倒好并已凝固的肉汤固体培养基上，摇匀、待凝、37℃ 培养过夜。

(6) 观察出现噬菌斑数，并估计噬菌体裂解液的效价 (噬菌体数/每毫升)。

3. 转导

A. 点滴法：

(1) 取预先倒好的 EMB 培养基二皿，在皿底用玻璃铅笔按下图的样子画好。

(2) 取受体菌（经活化后菌液）一环，按上述图示涂二条菌带，37 培养 1.5 小时。

(3) 从温箱中取出培养皿，在二个圆圈和四个方格处，各滴加一环噬菌体裂解液（先滴加圆圈处再滴加方格处），圆圈处为噬菌体对照，方格处为转导试验，菌带为受体菌对照，37 培养二天，观察结果。

B. 涂布法：

(1) 取预先倒好的 EMB 培养基四皿，其中一皿加 0.1 毫升噬菌体裂解液，用于对照；一皿加 0.1 毫升经活化后受体菌，也用于对照；另二皿加噬菌体裂解液和受体菌各 0.05 毫升。

(2) 用 3 支灭菌玻璃涂棒涂布上述各组培养皿，37 培养二天，观察结果。

C. 平板注入法：

(1) 将噬菌体裂解液用肉汤稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ，从各稀释度吸取 2 毫升裂解液于含有 2 毫升经活化后受体菌的离心管中，同时以只加噬菌体裂解液（2 毫升 10^{-1} 裂解液加 2 毫升肉汤培养液）和只加受体菌（2 毫升经活化后受体菌加 2 毫升肉汤培养液）为对照。共六支灭菌离心管，37 保温 15 分钟。

(2) 取出上述 6 支离心管，3500 转/分离心 10 分钟，弃上清液，打匀菌块，用生理盐水洗涤一次，3500 转/分离心 10 分钟，弃上清液，打匀菌块，各加 2 毫升生理盐水制成菌悬液。

(3) 从上述菌悬液中各吸取 0.1 毫升于预先倒好的半乳糖基本固体培养基中（转导各二皿，对照各一皿，共 10 皿），用六支灭菌玻璃涂棒涂布上述各组培养皿，37 培养二天，观察结果，计算出现的转导子数。

六、实验结果

1. 噬菌体效价（噬菌体数/毫升）：

2. 转导试验：

转 导 试 验	点 滴 法			涂 布 法			
	受体菌	噬菌体 裂解液	裂解液 +受体菌	受体菌	裂解	裂解液 +受体菌	
菌落生长情况							
菌落色泽发酵 情 况							
转导频率							
转 导 试 验	平 板 注 入 法						
	受体菌	裂解液	转 导 子 数/皿				转导子 数\毫升
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
菌落生长情况							
菌落色泽发酵 情 况							
转导频率							

$$\text{转导频率} = \frac{\text{转导子数 / 毫升}}{\text{噬菌体总数 / 毫升}} \times 100\%$$

实验十六大肠杆菌的重组子遗传分析

一、实验原理

在大肠杆菌的 Hfr 与 F⁻ 接合中，供体 Hfr 细菌的染色体转移到受体 F⁻ 细菌去的过程中，为了减少供体亲本细菌的数量，必须抑制它的生长，即对供体菌进行反选择。所以供体要用不同于受体 F⁻ 的营养缺陷型菌株，或对某种抗菌素及噬菌体敏感的菌，以作反选择的性状。

根据遗传学的研究知道大肠杆菌的染色体是环状的、封闭的单倍基因组（见图 16-1）。在 Hfr × F⁻ 中，Hfr 的染色体由原点起向 F⁻ 转移，Hfr 细菌的基因按一定的顺序依次地出现在 F⁻ 受体（见图 16-2）。离原点较近的基因先进入 F⁻ 受体，重组频率较高，出现的重组子多；离原点远的基因进入 F⁻ 细胞迟，重组频率低，出现的重组子少。据此，我们可以进行基因定位。

大肠杆菌的杂交必须通过不同型细胞的接触，但在接合过程中，细胞会分离，供体菌的染色体在转移过程中会自发断裂，故 Hfr 菌的基因在重组子中呈梯度出现，也提供了基因定位的可能性（见图 16-3）。

Hfr × F⁻ 中，接合的随机中断，导致重组子分布。

转移起点在 Pro 和 Lac 之间，表示含有不同长度的转移的染色体片段。

大肠杆菌的重组频率较低，即使是高频重组，其重组频率也在 10⁻³—10⁻⁴ 之间。为了在一个较大的杂交群体中发现为数较少的重组子，就要应用选择性培养基。供体亲本细胞，在选择性培养基上不能生长，只有重组子能长，因此在选择性培养基上长的菌落即为重组子。所以选择性培养基的确定与选择性标记有关，选择性标记有营养缺陷、糖发酵、抗药性标记等；相应的选择性培养基有基本培养基、伊红美蓝培养基以及培养基中加某种抗菌素或药

物等。根据实验要求来确定选择性标记和选择性培养基。在我们的实验中以营养缺陷为选择性标记，基本培养基是选择性培养基，在基本培养基上长的菌即为重组子。然后再分析一定数量的重组子中各非选择性标记的分离。在我们的实验中，选用各种糖发酵基因作为非选择性标记，根据各非选择性标记的重组百分数，确定这些糖发酵基因在染色体上的位置。

这个试验的适宜条件是在新鲜的肉汤培养液中，以 4×10^8 /毫升的 F⁻细菌和 2×10^7 /毫升的 Hfr 菌混合，其比例是 1 个 Hfr 菌对 20 个 F⁻菌，37℃ 通气接触 100 分钟。然后稀释取样，以使每皿得到适量的重组子作为母平板，再用影印培养法分析非选择性标记的分离。

二、实验材料

大肠杆菌 (E.coli K12) 的二个营养缺陷突变型菌株：
W1177ThrLeuthixylgalaramtlmal lacstr^r () F⁻; HfrCMetTrp。

Thr：苏氨酸，Leu：高氨酸，thi：维生素 B₁，xy1：木糖，gal：半乳糖，ara：阿拉伯糖，mtl：甘露醇，mal：麦芽糖，lac：乳糖，str^r：链霉素抗性，()：原噬菌体整合在宿主染色体上，Met：甲硫氨酸，Trp：色氨酸。

三、实验器具和药品

1. 用具：培养皿 (9 厘米)，灭菌三角瓶 (150 毫升)，灭菌吸管 (1、5 毫升)，灭菌离心管，灭菌空试管，圆木柱，丝绒。

2. 培养基

(1) 液体完全培养基：牛肉膏 0.5 克，蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.2，高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

(2) 固体基本培养基：Vogel 50 × 2 毫升，葡萄糖 2 克，琼脂 2 克，蒸馏水 98 毫升，pH7.0，高压灭菌 8 磅/英寸² 30 分钟。

(3) EMB 培养基 (eosinmethyleneblue 伊红美蓝)：糖*1 克，蛋白胨 0.8 克，NaCl 0.5 克，K₂HPO₄ 0.2 克，伊红 0.04 克，美蓝 0.0065 克，琼脂 2 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.2，高压灭菌 8 磅/英寸² 20 分钟。

(4) NaN₃ 培养基：牛肉膏 0.5 克，蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，NaN₃ 0.002mol/L，琼脂 2 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.2，高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

(5) 半固体培养基：琼脂 1 克，蒸馏水 100 毫升，高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

3. 生理盐水：NaCl 0.85 克，蒸馏水 100 毫升，高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

*此处所用的糖分别为木糖 (xyl)，半乳糖 (gal)，阿拉伯糖 (ara)，甘露醇 (mtl)，麦芽糖 (mal)，乳糖 (lac)。

四、实验说明

大肠杆菌的基因定位，除了根据供体基因在受体中的梯度出现而定位外，还可用中断杂交的方法以及根据基因重组计算重组频率来定位。

Hfr 菌与 F⁻接合，可根据供体各个基因进入受体的时间而定位。若我们于不同时间中断成对的接触细胞，然后取样在各种不同的选择性培养基上培养，最后统计各种选择性培养基上长出的菌落数。我们发现每个 Hfr 菌株染

染色体标记的转移有一定的顺序和时间推迟。同时证明了 Hfr 菌株的多样性，表现在转移起点、转移方面和标记的顺序不同。这主要是由于 F 因子整合入寄主染色体的不同位置，并以不同方向整合的结果（图 16-4）。

中断杂交的结果是供体菌的基因于接合后的不同特定时间在受体中出现，而且供体菌的基因以一定顺序出现。后进入受体的标记的出现频率低于先进入的标记（见图 16-5）。当二个标记的距离少于二分钟，中断杂交的方法是不可靠的，一般通过计算重组频率来定位。

中断杂交和基因梯度转移这二个杂交方法中，以供体菌前端二个基因为选择性标记。所以在杂交过程中只要 Hfr 细菌的前端两个选择性标记进 F⁻细菌，就能得到一个重组子，不管其他基因有没有进入 F⁻细菌。而要测定基因重组，则进入受体的 Hfr 染色体片段应是相同长度的，也就是说以这一片段的第一个基因和最后的一个基因作为选择性标记。分析这一杂交的重组子中的基因组合，计算出它们的重组频率，根据重组频率确定基因在染色体上的位置。例如 Hfr^{ade⁺leu⁺str^S} × F^{-ade⁻leu⁻str^r} 中重组频率的计算。

$$\text{重组频率} = \frac{\text{ade}^+\text{leu}^-}{(\text{ade}^+\text{leu}^+) + (\text{ade}^+\text{leu}^-)}$$

五、实验步骤

重组子遗传分析的实验步骤见图 16-6。

1. 菌液制备

（1）实验前 14—16 小时从冰箱保存的斜面菌种挑少量菌，接种于盛有 5 毫升液体完全培养基的三角烧瓶中，置 37℃ 培养过夜。

（2）第二天取出菌液，分别先吸出 2.5 毫升菌液，再各加入 2.5 毫升新鲜的液体培养基，充分摇匀，继续培养 3—5 小时。

（3）自温箱取出三角瓶，分别倒入灭菌离心管，3500 转/分离心 10 分钟。

（4）倒去上清液，打匀沉淀，各加入新鲜的完全液体培养基到原体积。

（5）从 W1177 与 HfrC 各取 4.5 毫升和 0.5 毫升菌液，放入一个灭菌的经 37℃ 预热的三角瓶中，充分摇匀。

2. 液体培养——杂交

（1）实验开始前，调节两只水浴锅，温度分别为 37℃ 和 45℃，并保持恒温。

（2）将盛混合菌液的三角瓶置于 37℃ 水浴中，保温 100 分钟。

（3）融化半固体培养基，并取 4 支灭菌空试管，每支吸入 3 毫升半固体培养基，于 45℃ 水浴保温。

（4）液体培养 100 分钟后，取出三角瓶，用 1 毫升吸管吸取 0.1 毫升混合菌液，放入 1 支半固体培养基，搓匀，倒入已加 Vogel 底层的培养皿中，摇匀，凝固后，37℃ 培养 48 小时，观察出现的重组子。重复两皿。

（5）取 HfrC 菌离心沉淀，倒去上清液，再离心洗涤三次，打匀沉淀，加入灭菌生理盐水到原体积，用 1 毫升吸管吸取 0.1 毫升 HfrC 菌液，放入半固体培养基，搓匀，倒入已加 Vogel 底层的培养皿中，摇匀。凝固后，37℃ 培养 48 小时，观察是否长菌落，作为对照。重复两皿。

3. 重组子的遗传分析

（1）取 2 只灭菌的培养皿，倒入 Vogel 培养基，待凝固后用接种针挑取重组子菌落，依次接种到有 Vogel 培养基的培养皿上（每皿 80 个菌落），37℃

培养 24 小时，作影印培养的原始培养皿。

(2) 融化 EMB 培养基 (包括 6 种糖原) 和 NaN_3 培养基，每种培养基倒 2 只培养皿，共 14 只培养皿。

(3) 取灭菌的丝绒一块，固定在圆柱形木块上，将原始培养皿倒置覆盖在丝绒上，用笔轻敲皿底。一块丝绒复制 2 只相同培养基的培养皿。当影印不同培养基的培养皿时，应另换一块灭菌的丝绒，重复操作，直至全部影印完毕。经影印的培养皿，放在 37 培养 24 小时，观察各种性状出现的比例。

六、实验结果记录

1. 杂交结果：

菌落数		菌落数	
		W1177 × HfrC	对照
组合	皿号		

2. 重组子的遗传分析

多基 培养 菌落数 皿号		EMB										NaN_3		
		xyl		mal		mtl		ara		lac			gal	
		发 酵	不发 酵	发 酵	不发 酵	发 酵	不发 酵	发 酵	不发 酵	发 酵	不发 酵		发 酵	不发 酵
重组百分数														

3. 根据重组百分数，写出这些基因在染色体上的顺序。

实验十七质粒 DNA 的扩增与提取

一、实验原理

质粒 (plasmid) 是一种双链共价闭合的环状 DNA，是染色体以外稳定的遗传因子。

细菌质粒复制的特性既决定于质粒本身又决定于宿主，它的复制必然受到双重控制。质粒在细菌细胞内的复制，可分为两种类型：严密型或称严密控制 (stringent control) 复制型和松弛型或称松弛控制 (relaxed control) 复制型。严密型质粒的复制似乎和染色体的复制受到相同因素的控制即染色体不复制时质粒也不复制，相对于一个染色体的质粒数不过 1—2 个。松弛型质粒的复制似乎受不同因素的控制，在整个细胞周期中随时可以复制，即当染色体复制已经停止，该质粒仍能继续复制，该质粒拷贝数可在 20 个以上。

在使用蛋白质合成抑制剂——氯霉素时，就一般情况来说，染色体 DNA 和质粒 DNA 的复制会逐渐减慢直至完全停止。但对 ColE1 及类似的质粒却恰好相反，在达到细胞内没有蛋白质合成，寄主染色体 DNA 的合成会减慢并逐渐

停止的情况下，而 pBR322 质粒 DNA 仍能复制 12—16 小时，直到每个细胞大约积累近 3000 个拷贝为止。利用这一特性，在培育菌液时加入蛋白质合成抑制剂——氯霉素，可以扩增大量的质粒，质粒 DNA 含量可达细胞 DNA 总量的 40—50%。

本实验首先是抽提出细胞总 DNA。提取时在温和条件下用溶菌酶和十二烷基硫酸钠 (SDS) 使细菌细胞溶菌裂解，溶菌酶可破坏细胞壁中的糖肽层，阴离子去污剂 SDS 可使细胞膜崩解，从而达到菌体充分裂解，此时菌液由稀变稠。细菌染色体 DNA 附在细胞膜碎片上。通过控制菌悬液和碱性 SDS 溶液的比例，使溶菌液的 pH 为 12—12.5。在此 pH 条件下，染色体 DNA 发生变性，而 pBR322 分子量较小且有具紧密的超线团结构，不发生变性。加入高浓度的酸性乙酸钾-乙酸缓冲液中和碱性溶菌液，变性染色体 DNA 凝聚成不溶性絮状物。SDS 与蛋白质形成复合物也被沉淀下来，SDS 且转变成溶解度较小的十二烷基硫酸钾，可使沉淀更完全。在上清液中若加入氯仿-异戊醇，使蛋白质去除更彻底。经乙醇沉淀法得到的 DNA 沉淀中会混有 RNA，再用 RNaseA 处理可去除 RNA，得到较纯的质粒 DNA 制品。

在进行转化前或检查质粒生物活性之前，常需检定质粒 ccc-DNA 的存在及纯度鉴定，因完整的双链结构对于转化活性来讲是必要的。在本实验中只采用平板琼脂糖凝胶电泳法。

二、实验目的

1. 学习提取质粒 DNA 的方法，并理解提取原理。
2. 用琼脂糖凝胶电泳法初步鉴定质粒 DNA 制品的纯度。

三、实验材料

E. Coli K12 (pBR322Ap^r.Tc^r) 菌株

四、实验器具和药品

1. 用具：高压消毒锅，水浴摇床或摇床室，离心沉淀器，电热恒温水浴锅，冰箱，电泳仪（包括平板电泳槽），100 微升、50 微升微量进样器，三角瓶，离心管，移液管，吸管等。

2. 试剂及其配方：

(1) 完全培养液 (LB 液) (pH7.2—7.4)：称取蛋白胨 (或多聚蛋白胨) 10 克，牛肉膏 5 克，氯化钠 5 克。加蒸馏水 800 毫升溶解上述试剂，用 1mol/LNaOH 调 pH7.2—7.4，补加蒸馏水至 1000 毫升。8 磅/英寸² 灭菌 30 分钟。

(2) 氨基苄基青霉素 (ampicillin, 简称 Ap) 溶液 (5 毫克/毫升)：称取氨基苄基青霉素 (医用粉剂) 5 毫克，溶于 1 毫升无菌蒸馏水，临用时配制。

(3) 氯霉素溶液 (7.5 毫克/毫升)：称取氯霉素 (医用粉剂) 7.5 毫克，溶于 1 毫升 75% 乙醇，临用时配制。

(4) ST 缓冲液 (SucroseTris-HClbuffer) (25% 蔗糖 50mmol/LpH8.0Tris-HCl)：称取 6.06 克 Tris (三羟甲基氨基甲酸)，溶于 800 毫升蒸馏水中，用 1mol/LHCl 调 pH 至 8.0 后，再用蒸馏水定容至 1000 毫克。取该液 75 毫升溶解 25 克蔗糖，即成 ST 缓冲液。冰箱内保存备用。

(5) 溶菌酶液 (4 毫克/毫升)：取 0.3 毫升 ST 液和 0.7 毫升蒸馏水于试管中，加入溶菌酶 (生化试剂) 4 毫克。临用时配制。

(6) 0.4mol/LNaOH (临用时配制)。

(7) 2% SDS : 称取 SDS (十二烷基硫酸钠) 1 克溶于 50 毫升蒸馏水中。

(8) 1% SDS-0.2mol/LNaOH : 取 2% SDS 和 0.4mol/LNaOH 按 1 : 1 (v/v) 混匀, 临用时配制。

(9) 3mol/LKAc-2mol/LHAc (pH4.8) : 称取醋酸钾 29.4 克, 先溶于 80 毫升蒸馏水, 加入 11.7 毫升冰醋酸后再补加蒸馏水到 100 毫升。

(10) 氯仿-异戊醇混合液 (v/v) : 将 24 毫升氯仿 (分析纯) 与 1 毫升异戊醇 (分析纯) 混合均匀, 临用前配制。

(11) 10 × SSC 溶液 : 称取柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.2 克, 氯化钠 4.4 克, 定容至 50 毫升蒸馏水。

(12) 0.1 × SSC 溶液 : 取 10 × SSC 溶液 1 毫升, 加蒸馏水至 100 毫升。

(13) 牛胰核糖核酸酶 (RNaseA) (用 0.2mol/LpH5.0NaAc 配成 2 毫克/毫升) : 称取 1.36 克醋酸钠 ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 溶于 90 毫升蒸馏水中, 用 2mol/LHAc 调至 pH5.0 后补加蒸馏水至 100 毫升。称取 RNaseA 2 毫克溶于 1 毫升 0.1mol/LNaAc 溶液中。将 RNaseA 液在 100 °C 中保温 10 分钟。4 °C 中保存备用。

(14) 0.2% 溴酚蓝-1.5% 蔗糖溶液 : 称取溴酚蓝 10 毫克, 用蒸馏水溶解, 再加 75 毫克蔗糖, 补加蒸馏水至 5 毫升。

(15) 电泳缓冲液 (40mmol/LTris-2mmol/LNaAc-2mmol/LEDTA- Na_2 , pH8.3) : 称取 Tris 9.69 克, 无水乙酸钠 3.29 克, EDTA- Na_2 1.49 克, 溶于 1950 毫升蒸馏水, 用浓酸调至 pH8.3, 再补加蒸馏水至 2000 毫升。

(16) 溴乙 (3, 8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶溴盐, 又称菲啶溴红)。

(E.B) 原液 (0.5 毫克/毫升) : 称取溴乙啶 (SERVA 产品) 5 毫克, 溶于 10 毫升电泳缓冲液中, 置棕色瓶于 4 °C 冰箱保存备用。临用用电极缓冲液 200 毫升加 0.6 毫升 E.B 原液 (E.B 有毒, 不可用口吸, 用洗耳球吸)。

(17) 0.5% 琼脂糖 (Agarose) 凝胶 : 称取琼脂糖 0.5 克入三角烧瓶内, 加入 100 毫升电泳缓冲液, 瓶口上加一小玻璃漏斗。置沸水浴中溶解至透明, 待凝胶冷至 60 °C 左右制凝胶平板。

五、实验说明

本实验所要提取的质粒 pBR322 是 ColE1 的衍生质粒。在每个细胞内约有 20 多个拷贝, 它带有抗氨基苄基青霉素基因 (Ap^r) 和抗四环素基因 (Tc^r), 根据该质粒的抗药性标记, 较容易检出和鉴定。

pBR322 质粒的分子量为 2.8×10^6 , 以共价闭环 DNA (covalently closed circular DNA, 简称 cccDNA) 的形式存在于细菌细胞质内。在抽提过程中, 一条链发生一处或多处断裂, 则另一条自由旋转而使分子内的扭曲消除形成松散型的分子叫开环 DNA (open circular DNA, 简称 ocDNA), 若两条链发生断裂的分子叫线型 DNA (linear DNA, 简称 lDNA)。

在质粒 DNA 制品中, 可能还会混有染色体 DNA、RNA, 以及上述三种类型的质粒 DNA。而用 pBR322 进行转化时, 要求其 DNA 属于 cccDNA。因此需对质粒 cccDNA 的存在进行检定及纯度鉴定, 其方法可用琼脂糖凝胶电泳法。

带电颗粒在电场作用下, 向着与其电性相反的电极移动, 称为电泳。以琼脂糖 (agarose) 凝胶为支持介质的电泳方法已广泛用于核酸的研究中, DNA 分子在高于其等电点的 pH 溶液中带负电荷, 在电场中向正极移动。DNA 分子在电场中通过凝胶介质而泳动, 除电荷效应外, 凝胶介质还有分子筛效应, 与分子大小及分子形态有关。由于带电分子的分子量差异或分子形态的不

同，电泳时呈现迁移位置的差异，如图 17-1。

电泳后用溴乙锭 (ethidiumbromide, 简称 E.B.) 染色。溴乙锭的分子结构如下：

它能插入核酸双链区的碱基对之间，形成一种荧光络合物，在 254nm 波长的紫外光照射下，呈现桔黄的荧光。

六、实验步骤

1. 细菌培养与质粒扩增

(1) 将 E.coli K12 (pBR322Ap^r、Tc^r) 菌株从完全培养基斜面上转接一环在 25 毫升完全培养液内，加氨基苄基青霉素 (Ap) 0.5 毫升，使 Ap 在培养液中的终浓度为 100 微克/毫升。37 振荡培养 12 小时。

(2) 从中取 0.6 毫升种子菌液加入 25 毫升完全培养液中 (加入 Ap 的终浓度仍应为 100 微克/毫升)，37 振荡培养 6 小时。(要求 O.D.600 达 0.6—0.7)。

(3) 加入氯霉素 0.5 毫升 (终浓度为 150 微克/毫升) 进行质粒扩增。37 继续振荡培养 14—16 小时。

注意：以上操作均应在无菌条件下进行和通气培养。

2. 溶菌

(1) 取二只离心管，各加扩增后菌液 10 毫升，以 3500 转/分钟，离心 15 分钟，倾去上清液，打散沉淀。

(2) 各加入 0.3 毫升溶菌酶液，置 20 恒温水浴锅中保温 30 分钟。每隔 5 分钟搅动一次。

(3) 各加入 0.6 毫升 1% SDS-0.2N NaOH 溶液混匀后置 0 冰浴 5 分钟。用 0.1 毫升移液管各管取样 0.03 毫升，置微量点滴板孔中，4 冰箱保存，留待电泳分析。

3. 染色体 DNA 和蛋白质的去除

(1) 在上述两管溶菌液中各加入经冰浴预冷的 3mol/L KAc-2mol/L HAc 0.45 毫升，充分混匀后于冰浴中静置 10 分钟。3500 转/分钟，离心 15 分钟。用滴管小心吸取上清液于一支空离心管中即两管上清液合并一管。

(2) 加入 1 毫升预冷的经混合均匀的氯仿-异戊醇，在冰浴中不断地轻轻搅拌 15 分钟。

(3) 3500 转/分钟，离心 15 分钟分相，取上层水相入另一离心管内 (抽提至水相与有机相界面无变性蛋白质为止)。

4. 质粒 pBR322DNA 的沉淀

(1) 在所得上清液中加入二倍体积的预冷的无水乙醇，将水与酒精缓缓搅拌均匀，把离心管置于盐冰浴 (即冰块内撒上粗盐若干混和) 中。

(2) 将离心管连同盛有盐冰的烧杯移置到 4 冰箱的冰格内 (或 -20 冰箱内)，2.5 小时以上，使质粒 DNA 沉淀。

(3) 取出后以 3500 转/分钟离心 15 分钟，倾去上清液，管底可见到白色沉淀。

(4) 用皱纹纸擦拭离心管内壁上的乙醇，并让乙醇挥发完。

注意：用无水乙醇沉淀质粒 DNA 时，若没有把上清液与乙醇混匀就置冰格内，由于乙醇在上，水在下，水就会结冰而影响 DNA 沉淀与离心。

5. 去除 RNA

(1) 在上述沉淀中加入 180 微升 0.1 × SSC 溶液，使沉淀溶解，再加 20

微升 $10 \times \text{SSC}$ 溶液。用微量进样器取样 30 微升于微量点样板孔中，留待电泳分析。

(2) 在余下的溶液中加入 40 微升核糖核酸酶液 (RNaseA)，于 37 恒温水浴锅中保温 1 小时。所得制品置 4 保存 (待转化用)。并取 30 微升于微量点滴板孔中，留待电泳分析用。

6. 质粒 DNA 纯度分析

(1) 铺好 0.5% 琼脂糖凝胶板。

(2) 点样

将留待电泳分析用的样品按取样顺序依次编为样品 1、2、3、4。在各号样品中加 6 微升溴酚蓝-蔗糖液，混匀后将各号样品分别全部点加在各个点样孔内。

(3) 在电泳槽的两极加入电极缓冲液。接通电源，样品端接负极，另一端接正极。电压梯度为 3—4V/cm，电流强度为 35—40mA，待溴酚蓝移动 4—5cm (大约电泳 2.5 小时)，关闭电源。

(4) 取电极液 200 毫升加入 0.6 毫升 E.B 原液，混匀，将凝胶板浸入 E.B 液中染色 20 分钟。

(5) 取出凝胶板置黑色托板上，在紫外层析灯下观察。

七、实验结果

1. 记录各实验现象

2. 绘出琼脂糖凝胶电泳图谱

正常结果见图 17-2。

(彭文仲、沈大棱)

实验十八大肠杆菌转化实验

一、实验原理

转化是指一种生物由于接受了另一种生物的遗传物质，从而获得了后者的某些遗传性状或发生遗传性状改变的现象。

1928 年，F.Griffith 在肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 中发现了转化现象后，直到 1944 年转化因子的本质才被 O.T.Avery 等所鉴定，这是说明遗传物质基础是 DNA 的第一个明确的实验根据。

关于细菌的转化的感受态存在着两种假设，即局部原生质化和酶受体假设。本实验采用菌株 *E. coli* K12C600 作为受体。用氯化钙处理受体使其处于感受态，此时其细胞膜的通透性发生变化，可以促进转化因子 pBR322 的吸收，但这方面的机制还有待于研究。

在一定条件下，将质粒 pBR322 与感受态的受体菌共同保温，质粒 DNA 分子就能进入受体细胞。培养在含有氨基苄基青霉素的完全培养基上，筛选转化体 (transformant)。

二、实验目的

理解转化的原理和学习用质粒 pBR322 转化大肠杆菌的方法。

三、实验材料

E. coli K12C600

四、实验器具和药品

1. 用具：水浴摇床 (或摇床室)，离心沉淀器，50 微升微量进样器，三角瓶，移液管，离心管，培养皿，试管等。

2. 试剂与配方

(1) 完全培养液 (LB 液) (pH7.2—7.4) : 称取蛋白胨 (或多聚蛋白胨) 10 克, 牛肉膏 5 克, 氯化钠 5 克。加蒸馏水 800 毫升溶解上述试剂, 用 1mol/LNaOH 调 pH7.2—7.4, 补加蒸馏水至 1000 毫升。8 磅/英寸² 灭菌 30 分钟。

(2) 完全固体培养基: LB 液+2%琼脂, 8 磅/英寸² 灭菌 30 分钟。

(3) 氨基苄基青霉素 (Ap) 液 (20mg/ml) : 称取 Ap (医用粉剂) 20 毫克, 加无菌蒸馏水 1 毫升, 临用时配制。

(4) 氯化钙缓冲液 (0.1mol/LCaCl₂ · 2H₂O-0.25mol/LKCl-5mol/LMgCl₂ · 6H₂O-5mmol/LTris-HClpH7.6) : 称取 Tris (三羟甲基氨基甲烷) 0.03025 克溶解于 40 毫升蒸馏水, 用 1mol/LHCl 调至 pH7.6, 再将 0.735 克氯化钙, 0.931 克氯化钾, 0.051 克氯化镁逐一加入使之溶解, 补加蒸馏水定容至 50 毫升。15 磅/英寸² 灭菌 15 分钟。4℃ 冰箱保存。

(5) 氯化钠缓冲液 (0.1mol/LNaCl-5mmol/LMgCl₂ · 6H₂O-5mmol/LTris-HClpH7.6) : 称取 Tris 0.03025 克溶于 40 毫升蒸馏水, 用 1mol/LHCl 调 pH 至 7.6。再将 0.2925 克氯化钠, 0.051 克氯化镁逐一加入, 使之溶解, 用蒸馏水定容至 50 毫升。15 磅/英寸² 灭菌 15 分钟, 4℃ 冰箱保存。

(6) 1mol/LHCl: 取浓盐酸 0.84 毫升, 加蒸馏水至 10 毫升。

(7) 无菌蒸馏水。

五、实验说明

质粒 pBR322 携带着抗氨基苄基青霉素基因 (Ap^r) 和抗四环素基因 (Tc^r), 而 E. coli K12C600 对 Ap、Tc 是敏感的。把 pBR322 与 C600 混合一定时间后, pBR322 就能进入感受态的受体菌。带有质粒 pBR322 的受体菌就具有抗 Ap、Tc 的特性, 实现了遗传物质的转移。这种被质粒所转化的受体细胞此时就叫转化体 (transformant)。筛选转化体时, 将 pBR322 与 C600 的混合菌培养在含有 Ap、Tc 的完全培养基平板上。结果只有转化体才能长, pBR322 不能长, 而 C600 由于不抗 Ap、Tc 被杀死。同时以 E. coli C600, pBR322 作对照, 分别涂布在含 Ap、Tc 的完全培养基上, 若培养基平板上都不出现菌落, 只有混合菌的培养基平板上生长有菌落, 此菌为转化体。其结果表明前一实验所提取的质粒 pBR322DNA 制品中具有生物活性的质粒 DNA。

其实验过程可概括为图 18-1。

六、实验步骤

1. 受体菌培养与处理

(1) 接种一环 E. coli K12C600 于 5 毫升完全培养液中, 37℃ 振荡培养 14 小时。

(2) 取 1.5 毫升转接在 25 毫升完全培养液中, 37℃ 振荡培养 2—3 小时。

(3) 取二支无菌离心管, 各加入 10 毫升培养菌液。3500 转/分钟, 离心 15 分钟, 倾去上清液, 用接种环把沉淀物搅拌均匀。

加 5 毫升预冷的氯化钠缓冲液, 使两管合并为一管。

(4) 3500 转/分钟, 离心 15 分钟, 倾去上清液, 搅匀沉淀。

(5) 加入冰浴预冷的氯化钙缓冲液 5 毫升, 冰浴保温 25 分钟。

(6) 3500 转/分钟, 离心 15 分钟, 弃去上清液, 搅匀沉淀。加 0.3—0.5 毫升冰浴预冷的氯化钙缓冲液制成感受态的细胞悬浮液。

2. 转化

按下表操作：

在冰浴中放置 1 小时以上。以上组别依次称为原始样品液、
、
。

3. 平板培养

(1) 将上述原始样品液、
、
分别用预冷的氯化钙缓冲液定量到 1.5 毫升，此时依次分别称为样品稀释液、
、
(即均为 10^{-1})。然后分别稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 。

(2) 涂布平板培养

每 100ml 完全培养基中加入氨基苄基青霉素 0.5 毫升，使其在培养基中的终浓度为 100 微克/毫升。每一平板接种量均为 0.1 毫升，采用涂布法，操作见下表所示。

组别	平板	
	稀释倍数	含 ApLB 培养基
受体菌对照组		10^{-1}
质粒 DNA 对照组		10^{-1}
转化实验组		10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

每一稀释度涂布二皿。37℃ 培养 24 小时至 48 小时。

注：LB 中若要加 Tc，其 Tc 在 LB 中的终浓度一般为 20 微克/毫升。

七、实验结果

按下表记录结果：

(彭文仲、沈大棱)

实验十九化学诱变物的细菌检测试验 (Ames 法)

一、实验原理

一些化学物质在哺乳动物体内经过酶的作用转化为终末致癌物，这些活性致癌物多半能在微生物中诱发突变，因此，一般说来，诱变剂相当于致癌物。这样，利用从哺乳动物细胞里提取的酶在体外代谢活化化学物质后，如该物质能诱发细菌突变，或未经代谢活化就能诱发突变者，都可初步认为这种诱变剂可能是潜在的致癌物。

二、实验材料

测试菌种：鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 组氨酸和生物素缺陷的突变株 (His^- , bio^- , $uvrB$, rfa) TA1535, TA1537, TA1538, TA98 和 TA100。其中，TA100 和 TA1535 用来检测诱发碱基置换突变的诱变剂，其余三枝检测引起移码突变的诱变剂，但也有报告说 TA100 可同时检测两类突变。

三、实验器具和药品

1. 配制培养基

(1) 斜面培养基：牛肉胨 0.5 克，蛋白胨 1 克，NaCl 0.5 克，琼脂 2 克，蒸馏水 100 毫升，pH7.2。高压灭菌，15 磅/英寸² 15 分钟。

(2) 液体完全培养液：成分同上，不加琼脂，分装成每试管 5 毫升。灭菌同上。

(3) 底层基本培养基：Vogel50 × 2 毫升，加入葡萄糖 2 克，琼脂 1.5 克，蒸馏水 98 毫升。高压灭菌 8 磅/英寸² 20—31 分钟。

(4) 上层半固体培养基：每 100 毫升培养基中含琼脂 0.7—1 克，NaCl 0.5 克，0.5mmol/L 组氨酸盐酸盐和 D-生物素的混合液 10 毫升。

2. 制备 S-9：诱导大鼠肝脏酶系的活性：选成年雄性大鼠 3 只（每只体重 150—200 克），按每公斤体重腹腔注射多氯联苯油溶液 2.5 毫升（多氯联苯由玉米油配制，浓度为 200 毫克/毫升）。注射后第 4 天起大鼠禁食 12 小时，然后断头、放血、取肝。肝脏混合称重，用 0.15mol/L KCl 溶液洗涤三次，剪碎，每克肝（湿重）加 3 毫升 0.15mol/L KCl 溶液，制成匀浆；9,000g 离心 10 分钟，取上清液，分装在小指管里，每管 1—2 毫升。冻存在液氮里或液氮速冻后贮存在 -20℃ 下（或贮存在 -40℃ 的冰箱中）备用。在取肝以后的操作过程中，所用的器皿、刀剪、溶液都需保持无菌，并在 0—4℃ 下进行。

3. 制备在使用 S-9 时所离的各种溶液

(1) 0.2mol/L pH7.4 磷酸缓冲液：Na₂HPO₄ · 12H₂O 7.16 克，KH₂PO₄ 2.72 克，加水至 100 毫升。高压灭菌 15 磅/英寸² 15 分钟。

(2) 盐溶液：MgCl₂ 8.1 克，KCl 12.3 克，加水至 100 毫升，高压灭菌。

(3) NADP（辅酶Ⅱ）和 G-6-P（葡萄糖-6-磷酸钠盐）使用液：每 100 毫升使用液中含 NADP 297 毫克，G-6-P 152 毫克，0.2mol/L pH7.4 磷酸缓冲液 50 毫升，盐溶液 2 毫升，加水至 100 毫升。过滤除菌，经无菌试验后分装，-20℃ 贮存。

四、实验说明

1. 菌种鉴定：在实验前需先鉴定测试菌种的一些突变性状是否继续存在，如菌液中已有部分菌体丧失突变性状，则需作单菌落分离，挑选出保持突变性状的细菌作为测试菌种。需鉴定的突变性状如下：

(1) 组氨酸缺陷突变（His⁻）：在不含组氨酸的培养基上不生长。

(2) 细菌荚膜脂多糖屏障缺陷突变（rfa）：在接种了细菌的完全培养基上放一直径为 0.6 厘米的圆形滤纸，滴上 10 微升结晶紫溶液（1 毫克/毫升）。37℃ 培养 12—24 小时，在滤纸四周产生一道透亮的抑制圈，表明 rfa 存在，因为这种突变允许结晶紫这样的大分子进入细菌体内，并抑制其生长。而野生型细菌的生长不受抑制。

(3) DNA 切除修复系统缺陷突变（uvrB）：在完全培养基上划线接种野生型菌种和测试用突变菌，培养皿的半侧用黑纸遮盖，置 15W 紫外灯下 33 厘米处照射 6 秒钟（TA98 和 TA100 照射 8 秒钟），37℃ 培养 12—24 小时。突变菌应在遮光处生长，照光处不生长；野生型菌则在照光和遮光处都生长。

(4) 抗氨苄青霉素因子（Ap^r）：TA98 和 TA100 都带有 pKM101 质粒，上面有抗氨苄青霉素因子。先在完全培养基上划一道氨苄青霉素溶液（8 毫克/毫升 0.02mol/L NaOH），待干后，分别划线接种 TA98、TA100 和野生型细菌，其方向正好同氨苄青霉素溶液的划线方向相垂直。37℃ 培养 12—24 小时后，在氨苄青霉素溶液扩散范围内野生型细菌不长，只有带抗药因子的 TA98 和 TA100 能生长。图 19-1 是菌种鉴定操作简图。

(5) 待测菌种的自发回复突变的菌数：每一测试菌株的自发回变菌数应

保持相对稳定。根据国内外一些实验室的报导，各个测试菌株的自发回变数的变动范围如下：TA98（14—75），TA100（60—220），TA1535（5—30），TA1537（3—25），TA1538（5—40）。括号中数字是指每皿接种 10^7 — 10^8 细菌中的回复突变数。

2. 诱发阳性指示剂：一般可用 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG 或 NTG, 用于 TA100 和 TA1535)，9-氨基吡啶(9-AA, 用于 TA1537)，亚硝基(2-NF, 用于 TA98, TA1538) 等试剂为实验时的诱变阳性指示剂。另外，加 S-9 试验时，黄曲霉毒素 B₁，需经 S-9 代谢活化后才出现诱变作用，故可用于 S-9 活性的鉴定。

五、实验步骤

1. 细菌培养：从培养在斜面培养基上的测试菌种中挑取少量菌体，接种在 5 毫升完全培养液里，37℃ 培养 16 小时左右，供诱变试验用。此时细菌数目在 10^8 — 10^9 /毫升。

2. 纸片点样检测：每培养皿（直径为 9 厘米）加底层培养基 15 毫升，冷却凝固。取 3 毫升上层培养基，加入 0.1 毫升菌液，摇匀后倒入，铺在底层培养基上。用灭菌的滤纸圆片（直径 6 毫米）蘸待检物的溶液后，置于上层培养基上，每皿可放 1 到 5 张纸片（待检物如是脂溶性的，可用二甲基亚砜、乙醇、丙酮等作为溶剂）。37℃ 培养 48 小时。

3. 培养皿掺入检测：每培养皿加底层培养基 15 毫升，待凝。取 3 毫升上层培养基加 0.1 毫升菌液，再加待检物 0.1 毫升，充分摇匀后倒在底层培养基上，37℃ 培养 48 小时。操作程序见图 19-2，但不加 S-9。

4. 加 S-9 检测法：操作方法基本上与 2、3 相同，只是在每培养皿的上层培养基中还需加入 S-9 混合液 0.2 毫升。混合液的配制是把低温贮存的 S-9 置室温下融化，每 2 毫升中加入 10 毫升的 NADP 和 G-6-P 使用液。

混合液置冰浴中，用后多余部分弃去，下次实验时重配。

5. 阳性对照和 S-9 活性

鉴定：每次实验都需作阳性对照（用阳性指示剂代替待检物，以鉴定测试菌株的有效性），空白对照（包括不加待检物的对照，不加待检物只加 S-9 的对照）。

S-9 的活性也需加以鉴定。黄曲霉毒素 B₁ 经过 S-9 活化后，如出现诱变作用，则表明 S-9 有活性。

六、实验结果

1. 诱变性的定性鉴定：用纸片点样检测时，凡在点样纸片周围长出一圈密集的回变菌落者，该待检物即为诱变阳性物质。反之，如只出现散在的回变菌落，其数目与对照相近，则记为阴性。培养皿掺入检测法是直接查点培养基上长出的回变菌落数。凡在背景生长的菌苔上长出的回变菌落数，比对照组的自发回变菌落数增加一倍以上的，记为阳性反应。

2. 诱变性的定量鉴定：用培养皿掺入检测法时，计算不同浓度的待检物所诱发的回变菌落数，在一定的浓度范围内，阳性诱变物的浓度同回变菌落数一般有一线性关系。浓度高到某一程度时，往往出现抑制细菌生长的现象，从而使回变菌落数下降。因此，可以用这些数据来确定最有效的诱变浓度，抑菌生长的浓度以及不致诱发突变的所谓“允许浓度”或“安全浓度”。

3. 数据记录和分析：培养皿检测试验时，每一待检物浓度一般需至少做三

个培养皿，计算每只培养皿上的菌落数后，求出平均数。一般在平均数后应注明标准误差，即平均数 ± 标准误差。标准误差 ($S_{\bar{x}}$) 的计算公式为：

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

x 为每只培养皿计数得到的回变菌落数；n 为所做的培养皿的皿数。

把待检物名称和数据填入表内：

附表

菌株 S-9 浓度 (微克/皿)	TA98		TA100		TA1535	
	不加	加	不加	加	不加	加
0 每皿平均回变菌落数						
10 每皿平均回变菌落数						
100 每皿平均回变菌落数						

4. 注意事项

(1) 上层培养基要放在 45℃ 水浴中保温，这样琼脂不会凝固；如温度过高，会烫死细菌和使 S-9 中的酶失活。

(2) 培养皿掺入检测试验计算菌落数时，要注意有无背景生长的菌苔，一般可用低倍显微镜 (×40) 观察。如无菌苔而出现很多菌落者，应判为“假阳性”。这是由于待检物杀死了大部分细菌，使残存的少数细菌得以利用培养基中微量的组氨酸和生物素长成肉眼可见的菌落，但这不是诱发出现的回变菌落。

(3) 测试菌株的斜面传代次数不宜太多，尤其是 TA98 和 TA100，因为经常传代很容易丢失突变性状，特别是 R 因子 (抗氨苄青霉素因子)。另外，保存菌种时，0.8 毫升新鲜肉汤菌液加 0.07 毫升二甲基亚砷 (至少为分析纯)，在 -80℃ 低温下或液氮中冻存。

(4) 如果制备 S-9 有困难，可以不用 S-9。但这样的检测试验，无法查出必须经过酶的代谢活化才会出现诱变作用的诱变剂。

实验二十人的外周血淋巴细胞培养

一、实验原理

外周血液中的小淋巴细胞，几乎都处在 G_1 期 (或 G_0 期)，一般情况下是不再分裂的，在培养液中加入植物凝血素 (PAH) 时，这种小淋巴细胞受刺激转化成为淋巴母细胞，随后进入有丝分裂。这样经过短期培养，秋水仙素的处理，低渗和固定，就可获得大量的有丝分裂细胞。本方法已为临床医学、病毒学、药理学、遗传毒理学等方面广泛应用。

二、实验目的

掌握人体微量血液体外培养制备染色体标本的方法。

三、实验材料

人的外周血淋巴细胞。

四、实验器具和药品

1.用具：2 毫升灭菌注射器，离心管，吸管，试管架，量筒，培养瓶，试剂瓶，酒精灯，烧杯，载玻片，切片盒，天平，离心机，恒温培养箱，显微镜。

2.器皿的清洗和消毒玻璃器皿在使用前，均应用肥皂水洗刷，清水冲净，烘干后浸泡在洗液中至少 2 小时，再用流水冲洗，烘干待消毒。

将已洗净、烘干的玻璃器皿装入铝盒或用纸包装，放入干燥消毒箱内，150 小时。

隔离衣、口罩、橡皮塞、注射用针筒等则用高温高压消毒(15 磅 15 分钟)。

3.药品

(1) RPMI “1640”培养基：称取“1640”粉末 10.5 克，用 1000 毫升的双蒸水溶解，如溶液出现混浊或难以溶解时，可用干冰或 CO₂ 气体处理，如 pH 值降至 6.0 时，则可溶解而透明。每 1000 毫升溶液加 NaHCO₃ 1.0—1.2 克，以干冰或 CO₂ 气体校正 pH 至 7.0—7.2。立即以 5 号或 6 号细菌漏斗过滤灭菌，分装待用。

(2) 肝素：作为抗凝剂使用。称取该粉末 160 毫克(每毫克含 126 单位)，用 40 毫升的生理盐水溶解，此溶液的浓度为每毫升 500 单位。高压消毒 8 磅 15 分钟。

(3) 秋水仙素：作为有丝分裂的阻止剂，它能改变细胞质的粘度，抑制细胞分裂时纺锤体形成，使细胞分裂停留在中期。称取秋水仙素 4 毫克，用 100 毫升生理盐水溶解，用 6 号细菌漏斗过滤，然后放入冰箱 4℃ 保存。使用时用 1 毫升注射器吸取该溶液 0.05—0.1 毫升加入 5 毫升的培养物中，其最终浓度为 0.4—0.8 微克/毫升。

(4) 植物凝血素 (PHA)：是淋巴细胞有丝分裂刺激剂。提取 PHA 的方法有两种。一种比较简单，直接用四季豆的浸出液；另一种较复杂，最后制品为粉末。如用之得当，二种方法均可获得良好的效果。

盐水浸取法：最好用皮色四季豆，但其它颜色如红斑色、黑色、黄色、白色的四季豆亦可。取豆子 20 克，用水洗净可能粘附在种子外面的化学药物。先在水中浸过夜(4 天)，次日倒去水分，将豆子放入组织搅碎器内，加 30 毫升生理盐水，开动搅碎器使之成为粘糊状，向搅碎器再加 70 毫升生理盐水，混合均匀。置冰箱 24 小时。然后以 3000 转/分离心 15 分钟，取上清液，用生理盐水稀释 10 倍，5 号除菌滤斗过滤，分装小瓶，冰冻保存。

酒精乙醚提取法：四季豆 50 克，先用生理盐水洗净。将豆浸入 60 毫升盐水中，保存于 4℃ 冰箱内，24 小时后用组织搅碎器将其磨成匀浆，再加 140 毫升盐水，置 4℃ 冰箱中 24 小时，取出后以 6000 转/分离心 20 分钟，吸取上清液，调 pH 至 5.6 (用 0.1mol/L HCl 调) 之后，每 100 毫升上清液加 40 毫升无水酒精，加以搅拌，以 3000 转/分离心 15 分钟，取上清液，弃去沉淀。在每 100 毫升上清液中加入 170 毫升 10% 乙醚无水酒精(10 毫升乙醚+90 毫升无水酒精)以 3000 转/分离心 15 分钟，取沉淀放入培养皿中，在含有硅胶的抽气干燥器中抽气 2—4 天，沉淀物逐渐变得干硬。将沉淀物研磨成粉末，以 0.85% NaCl 液配成 1% 的溶液，此 PHA 溶液经细菌滤器过滤后分装在小瓶中，冰冻保存。使用时每 5 毫升培养物加 0.1 毫升即可。如果在得到沉淀物后的

干燥及研磨等过程中充分保持灭菌操作，那么配成的 PHA 溶液便无需用细菌过滤器过滤。

(5) 抗菌素

青霉素（以每瓶 40 万单位为例）：以 4 毫升生理盐水（或培养基）稀释，则每毫升含 10 万单位。取 1 毫升加入 100 毫升培养基中，则最终浓度为 100 单位/毫升。

链霉素（以每瓶 50 万单位为例）：以 2 毫升生理盐水（或培养基）稀释，则每毫升含 25 万单位。取 0.4 毫升（含 10 万单位）加入 1000 毫升培养基中，则每毫升含 100 单位（即 100 微克）。（100 万单位=1g，1g=1×10⁶ μg）。

(6) 姬姆萨染液：0.5 克姬姆萨粉末，加 33 毫升纯甘油，在研钵中研细，放在 56℃ 恒温水浴锅中保温 90 分钟，再加入 33 毫升甲醇，充分搅拌，用滤纸过滤，收集在棕色细口瓶中保存，作为原液。用时以磷酸缓冲液（pH7.4）1:10 稀释。

(7) 0.1mol/L 磷酸缓冲液：

pH7.4 - 7.6

A. Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O ₂	8.8 克
KH ₂ PO ₄ （无水）	2.67 克

溶解于 1000 毫升双蒸水中。

B. Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.164 克
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.3 克

溶解于 1000 毫升双蒸水中。

五、实验步骤

1. 培养液的分装：在无菌室或接种罩内，用移液管将培养液和其它各试剂分装入培养瓶，每瓶量为：

培养液（RPMI1640 或 M199）	4 毫升
小牛血清	1 毫升
PHA	0.2 毫升
肝素	0.05 毫升
双抗（青霉素加链霉素）	培养液中最终浓度各为 100 单位/毫升

用 3.5%NaHCO₃ 调 pH 到 7.2—7.4，分装到 20 毫升的玻璃瓶中，用橡皮塞塞紧，待用或置于 0℃ 条件下保藏。用前从冰箱内取出，放入 37℃ 恒温锅中温育 10 分钟。

2. 采血：用 2 毫升灭菌注射器吸取肝素（500 单位/毫升）0.05 毫升湿润管壁。用碘酒和酒精消毒皮肤，自肘静脉采血约 0.3 毫升，在酒精灯火焰旁，自橡皮塞向培养瓶内（内含有生长培养基 5 毫升）接种，轻轻摇动几次，直立置 37 ± 0.5℃ 恒温箱内培养。

3. 培养：置 37℃ 温箱内培养 66—72 小时。

4. 秋水仙素处理：培养终止前在培养物中加入浓度为 40 微克/毫升的秋水仙素 0.05—0.1 毫升，最终浓度为 0.4—0.8 微克/毫升，置温箱中处理 2—4

小时。

5.低渗处理：低渗液的种类较多，如 0.075mol/L 的 KCl 溶液，0.95%的枸橼酸钠溶液，用蒸馏水稀释 4 倍的 Hanks 液，也可直接用蒸馏水。秋水仙素处理完毕，小心地从温箱取出培养瓶，用滴管吸弃上清液，培养物沉积在瓶底，然后加入温育的低渗液 5 毫升，用滴管轻轻冲打成细胞悬液，装入离心管中置 37℃ 温箱内处理 20 分钟，使红细胞破碎，白细胞膨胀。

6.离心：以每分钟 1000 转，离心 5 分钟，弃去上清液，收集白细胞。

7.固定：固定液为甲醇：冰醋酸=3：1。每只离心管中，加入固定液 2—4 毫升，片刻后用滴管轻轻冲打成细胞悬液，在室温中固定 15 分钟后，离心，吸弃上清液，留下白细胞。

8.再固定：加入固定液 2 毫升，用吸管轻轻打散，室温下继续固定 15 分钟（过夜也可以）。

9.再离心：除去上清液，留下白细胞制片。

10.制片：向上述离心管中滴入固定液 0.5 毫升，用滴管小心冲打成悬液，从冰箱的冰格中或冰水中取出载玻片，每片滴加悬液 1—3 滴，用嘴轻轻吹散，用电风吹干，或在酒精灯火焰上微微烤干。

11.染色：用磷酸缓冲液（pH7.4）稀释后的姬姆萨染色液染色 20 分钟，然后倒去染液，用蒸馏水轻轻冲洗。

12.镜检：待稍干后，在显微镜下检查。先用低倍镜寻找良好的分裂相，然后用高倍油镜观察。

13.封片：用加拿大树胶封片。选择染色体清晰，分散度好的细胞进行显微摄影，进行核型分析（见图 20-1）。

六、实验注意事项

1.接种的血样愈新鲜愈好，最好是在采血后 24 小时内进行培养，如果不能立刻培养，应置于 4℃ 存放，避免保存时间过久，会影响细胞的活力。

2.在培养中成败的关键，除了至为重要的 PHA 的效价外，培养的温度和培养液的酸碱度也十分重要。人的外周血淋巴细胞培养最适温度为 37 ± 0.5 。培养液的最适 pH7.2—7.4。

3.培养过程中，如发现血样凝集，可将培养瓶轻轻振荡，使凝块散开，继续放回 37℃ 恒温箱内培养。

4.制片过程中，如发现细胞膨胀得并不大，细胞膜没有破裂，染色体聚集一团伸展不开，可将固定时间延长数小时或过夜。

七、实验结果

1.核型分析：人类每个体细胞有 46 条染色体，22 对常染色体和一对性染色体，男子是 46, XY；女子是 46, XX（见图 20-2）。求取以下三个参数：

（1）染色体的相对长度

$$= \frac{\text{单个染色体长度} \times 1000}{22 \text{ 条常染色体总长} + 1 \text{ 条 X 染色体长度}}$$

</PGN0156.TXT/PGN>

（2）臂比率 = $\frac{\text{长臂长度}}{\text{短臂长度}}$

$$(3) \text{ 着丝点指数} = \frac{\text{短臂长度}}{\text{染色体全长}} \times 100$$

可以将人的 46 条染色体分成 A、B、C、D、E、F、G 七群，作为进一步识别和鉴定染色体的依据。

实验二十一 姊妹染色单体色差方法

一、实验原理

在 DNA 复制过程中，核苷的类似物 5-溴脱氧尿嘧啶核苷（5-Bromodeoxyuridine 简称 BrdUrd）或 5-碘尿嘧啶核苷（5-Iodo-2'-deoxyuridine 简称 IdUrd）可以代替核苷酸掺入新合成的 DNA 链，并占有胸腺嘧啶（Thymidine, T）的位置。哺乳类细胞在含有适当浓度的 BrdUrd 的培养液中经历二个分裂周期之后，其中期染色体的两个单体的 DNA 双链在化学组成上就有了差别：即一条染色单体的两股 DNA 的 T 位完全由 BrdUrd 代替，而另一条染色单体的两股 DNA 中的一股含 BrdUrd，另一股则不含 BrdUrd。这样的细胞经过制片和苯并咪唑荧光染料（Hoechst-33258）染色后，在荧光显微镜下可观察到两条姊妹染色单体显示强弱不同的荧光。两股 DNA 链都含有 BrdUrd 的单体荧光较强，其中只有一股有 BrdUrd 的单体荧光较弱。但由于荧光染料发出的荧光消失较快，只能立刻在荧光显微镜下照相而不能长期保存。1974 年 Korenberg 和 Freedlender 改进了这一技术，单独用 Giemsa 染色即获得姊妹染色单体差别染色（sister-chromatid differential staining 简称 SCD）（图 21-1）。

来自一个染色体的两条单体之间同源片断的互换称为姊妹染色单体互换（sister-chromatid exchange, 简称 SCE）。这种互换是完全的，对称的。由于姊妹染色单体染色上的明显差异，如果姊妹染色单体间在某些部位发生互换，则在互换处可见有一界限明显、颜色深浅对称的互换片段，故 SCE 易于计数，即使在一定距离内发生多次互换，也可被检测出来。

目前认为 SCE 反映了 DNA 的损伤，可以使用 SCE 作为哺乳类动物突变形成的指标。由于 SCE 分析方法比观察染色体畸变更简便、迅速、敏感，并表现出很好的剂量效应关系，因此，目前已将此法列为检测诱变剂或致癌物的常规指标之一。

二、实验目的

1. 了解姊妹染色单体差别染色技术的原理和制作 SCE 标本的方法。
2. 通过 SCE 标本的观察，掌握 SCE 计数方法。

三、实验材料

人的外周血。

四、实验器具和药品

1. 用具：2 毫升和 1 毫升灭菌注射器，吸管，移液管，离心管，量筒，烧杯，无菌青霉素瓶，试剂瓶，培养瓶，酒精灯，载玻片，天平，紫外灯（15W），离心机，恒温培养箱，显微镜。

2. 药品配制：RPMI 1640，肝素，植物凝血素（PHA），秋水仙素，青、链霉素，姬姆萨染液等的配制方法见本实验第二十，《人的外周血淋巴细胞培养》。

（1）小牛血清：最好经过透析处理。将小牛血清装入透析袋中，用线扎紧封口，小心检查，切勿有漏孔。然后将透析袋放在盛有双重蒸馏水的玻璃

器皿中，每隔 1—2 小时换一次水，搁置在 4℃ 冰箱中，24 小时后赛氏滤器灭菌过滤。

(2) 3.5%NaHCO₃ 溶液：称 3.5 克 NaHCO₃，用 100 毫升双蒸水溶解，10 磅 15 分钟高压灭菌，调节 pH 用。

(3) BrdUrd 溶液：用无菌青霉素瓶，在普通条件下用分析天平称取 BrdUrd 2 毫克，然后在无菌室内加入灭菌生理盐水 4 毫升，母液的浓度为 0.5 毫克/毫升。用黑布避光，置冰箱中保存。最好现配现用。

(4) 1mol/LNaH₂PO₄，pH8.0 的溶液；称取 120 克 NaH₂PO₄，加入 1000 毫升双蒸水，用 NaOH 粉末调 pH 至 8.0 即可。

(5) 2×SSC 溶液(0.3mol/L 氯化钠，0.03mol/L 枸橼酸钠，称取 NaCl 17.54 克，枸橼酸钠 8.82 克，各用蒸馏水 1000 毫升溶解，使用时两溶液等量混合。

(6) pH 为 6.8 的 mol/L/15 磷酸缓冲液：

甲液：取 KH₂PO₄ 9.08 克，溶于 1000 毫升蒸馏水中。

乙液：取 Na₂HPO₄·2H₂O 11.88 克或 Na₂HPO₄·12H₂O 23.87 克，溶于 1000 毫升蒸馏水中，将 50.8 毫升的甲液与 49.2 毫升乙液混合，即得 pH 为 6.8 的 mol/L/15 磷酸缓冲液。

五、实验步骤

(一) 在无菌条件下，用 20 毫升的青霉素瓶分装 5 毫升培养液，其中 RPMI 1640 占 80%；小牛血清占 15—20%；PHA 0.2 毫升；青霉素 100 单位/毫升；链霉素 100 微克/毫升。最后用 3.5%NaHCO₃ 调节 pH 至 7.2—7.4。

(二) 每 5 毫升的培养液中加入 BrdUrd 0.1 毫升，最终浓度为 10 微克/毫升。

(三) 每瓶培养液中加入 0.3 毫升静脉血，轻轻摇匀，用黑布避光，立即置 37℃ 温箱中培养。

(四) 培养 72 小时左右，加入秋水仙素 0.4—0.8 微克/毫升，继续培养 4 小时。

(五) 按常规收集细胞，用 0.075mol/LKCl 或蒸馏水低渗 20 分钟，用甲醇：冰醋酸 3：1 配制的固定液固定两次，每次 15 分钟，用气干法制片，一天以后将染色体制片放入 70—80℃ 烤箱中烘烤 1—2 小时，或放在 37℃ 温箱中存放备用。

(六) 染色体标本的差别染色方法有两种：

1. 碱的热溶液处理：将染色体标本浸在 88℃ 的 1mol/LNaH₂PO₄ (pH 为 8.0) 的溶液中，处理 20 分钟，取出后立即用蒸馏水冲洗，用常规 Giemsa 染色 5 分钟，再用蒸馏水冲洗，干燥，观察。

2. 紫外灯照射诱发：染色体标本在 37℃ 条件下搁置 24 小时后取出，放在 45—48℃ 的水浴锅上，覆盖一层 2×SSC 溶液 (0.3mol/LNaCl，0.03mol/L 枸橼酸钠)，15W 紫外灯照射 20—30 分钟，灯管与载玻片之间距离为 6 厘米 (照射期间防止 2×SSC 溶液干涸)。照射完毕，用蒸馏水冲去 2×SSC，用 3%Giemsa (pH 6.8 磷酸缓冲液稀释) 染色 5—10 分钟，水洗，气干后镜检。

(七) 在普通光学显微镜下观察，可见姊妹染色单体呈现鲜明的深浅不同的颜色 (见图 21-2)。

六、注意事项

1. 在本方法的基础上, 如将培养基组成、培养液的酸碱度、培养温度或培养时间等因素略加变动, 可适用于其他一些哺乳动物、鸟类或两栖类动物淋巴细胞的培养, 用以观察它们的姊妹染色单体色差。例如中华大蟾蜍淋巴细胞培养时, 所用的培养基组成除 RPMI 1640 外, 还补充一定量的水解乳蛋白, 培养基的 pH 为 7.0—7.2, 培养温度为 26 。

2. BrdUrd 溶液最好现配现用, 一次使用不完, 必须有黑布避光, 4 冰箱保存。

3. BrdUrd 在培养开始时加入, 或在培养后的 24 小时加入均可。

4. 用紫外灯照射诱发姊妹染色单体互换时, 如紫外灯功率大, W 数高, 照射的时间就相应地减少。

七、实验结果

1. SCE 的计数方法

凡染色单体端部出现的互换计为一个 SCE, 在染色单体中间出现的互换计为 2 个 SCE; 在着丝粒部位发生的互换在判明不是两条染色单体在着丝部位发生扭转计为一次 SCE。

2. 选细胞轮廓完整, 染色体数为整二倍体的中期象进行 SCE 分析。每一样品, 一般选择 30 个细胞进行分析, 最后求得一个平均数。

供血者姓名	观察细胞数	每个细胞的 SCE	平均 SCE\细胞

实验二十二活体骨髓细胞姊妹染色单体色差方法

一、实验原理

活体中姊妹染色单体色差方法的原理与离体 SCE 相似。由于活体试验伴随有体内代谢活化, 为了解决 5-溴脱氧尿苷 (BrdUrd) 或 5-碘脱氧尿苷 (IdUrd) 在动物体内迅速降解的问题, 要在细胞 DNA 复制的两个细胞周期中, 不断补充外源的核苷类似物, 使 DNA 双链的化学组成形成差别, 经过分化染色处理, 才能使二条姊妹染色单体呈现深浅不同的色差。

二、实验目的

1. 了解活体 SCE 形成原理和方法。
2. 通过实验全过程操作, 制备出骨髓细胞 SCE 标本。
3. 熟悉 SCE 计数方法并对实验结果进行显著性测验。

三、实验材料

6—8 周龄的纯系小鼠, 体重为 20 克左右。

四、实验器具和药品

1. 用具: 手术剪刀 (12、16 厘米), 镊子 (10、12 厘米), 止血钳 (8、12 厘米), 手术用针和外科手术用丝线, 压制药片的压片机 (孔的内径为 0.5 厘米), 2 毫升灭菌注射器, 吸管, 离心管, 烧杯 (1.5、50 毫升), 量筒, 载玻片, 试剂瓶, 天平, 台秤, 紫外灯 (15W), 恒温水浴锅, 离心机, 显微镜。另备少许纱布, 酒精和碘酒棉球。

2. 药品配制

(1) 10% 酵母制剂: 称取干酵母粉 (上海酵母厂) 2.5 克, 葡萄糖 5.5 克, 加入 25 毫升 40 的温水。充分混匀, 置 40 温箱中保温 1.5—2 小时, 待液

体表面有少量气泡出现即可使用。

本实验采用酵母制剂的目的是刺激动物骨髓细胞，可增加有丝分裂中期相的数目。

(2) 秋水仙素溶液：称 5 毫克的秋水仙素，用 5 毫升生理盐水溶解。使用时按 4mg/公斤量注射。

(3) 0.85%生理盐水：0.85 克 NaCl，溶解在 100 毫升双蒸水中。

(4) 0.5%氯化钾：0.5 克 KCl，用 100 毫升双蒸水溶解。

(5) 3%姬姆萨染液：3 克姬姆萨粉末，用 50 毫升纯甘油和 50 毫升甲醇溶解（配制方法参照血培养试剂一节）。

(6) pH6.8 磷酸缓冲液：参照姊妹染色单体色差方法药品配制一节。

(7) 2×SSC 溶液：参照姊妹染色单体色差方法药品配制一节。

(8) 5-溴脱氧尿苷 (BrdUrd) 或 5-碘脱氧尿苷 (IdUrd)。

五、实验说明

1. 给药方法：可有三种即：多次注射法、皮下埋植法、活性炭吸附一次注射法。三种方法都可用 BrdUrd 或 IdUrd，它们对 SCD 的效果相同。本实验对三种给药方法详细介绍，各实验室可根据具体的条件选择使用。

(1) 多次注射法：供试小鼠腹腔内注射 IdUrd 10—15 次，每次 0.2 毫升，每隔一小时注射一次。总用量约 0.75 克/公斤体重。

(2) 皮下埋植法

(a) IdUrd 药片制备：

体重为 20 克的供试小鼠，称取 IdUrd 20—30 毫克，以绵白糖作为填充料（粘合剂），二者比例 1:1。两者混合后放入内径为 0.5 厘米的凹形模子内，插上内心。外加一压力，使药粉压成片剂，取出内心，将药片取出。

(b) IdUrd 药片的埋植：

将小鼠腹部向上，在腹中线大腿内侧下凹处用剪刀局部去毛，经碘酒、酒精消毒后用手术小剪剪一小口（约 0.5 厘米），将药片埋入皮下，缝合伤口。

(3) 活性炭吸附 BrdUrd 或 IdUrd 注射法

(a) 活性炭的制备：取 10 克活性炭于玛瑙研钵中研成粉末，在 200 毫升蒸馏水中悬浮 5 分钟，收集上半部悬浮液，经每分钟 1500 转，离心 15 分钟，获得更细的活性炭粉末。用 2.5%NaOH，蒸馏水及 2.5%HCl，依次分别洗 5 次，然后再用蒸馏水洗 15—20 次，直至洗出的水 pH 为中性或与洗前的水 pH 相同。离心收集活性炭置于烧杯中，180℃ 烤干。使用前每毫升 BrdUrd 溶液（10 毫克/毫升）或 IdUrd 溶液（20 毫克/毫升）加入 100 毫克活性炭，磁力搅拌 2 小时，使活性炭充分吸附 BrdUrd 或 (IdUrd)。如采用的是注射用活性炭（300—400 目过筛），不需经酸碱处理，直接吸附 BrdUrd 或 IdUrd，效果也很好。

(b) 腹腔注射：把吸附有 BrdUrd 活性炭悬浮液或 IdUrd 悬浮液 1 毫升注入腹腔内。

2. 实验动物分组：分对照组，受检药物低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照组。一般化学诱变剂和致癌物，供试动物雌雄各半为宜。

低剂量约为临床剂量的 5 倍，中剂量为 20 倍，高剂量为 100 倍。给药途径一般采用该药临床给药方法（如注射或灌服等）。用药时间视该药在所检测的器官中达到最高浓度所需时间而定。

3. 阳性药物：作为阳性药物对照，可采用环磷酰胺 (cyclo-phosphamide)、

丝裂霉素 C (mitomycinC) 或甲基磺酸甲酯 (methylmethanesulphonate)。它们的剂量分别为 10—30 微克/克体重, 0.5 微克/克体重, 5 - 10 微克/克体重。给药方法为腹腔内注射。

4. 待测物质: 如采用腹腔内注射, 则参照其溶解性质, 用生理盐水或易溶试剂溶解。用量一般以 0.1 毫升/10 克体重为宜。如口服 (灌胃) 给药, 通常用水, 生理盐水, 1% 甲基纤维素, 花生油和玉米油作为液体媒介物。

六、实验步骤

(一) 实验动物选用 6—8 周龄的纯系小鼠, 体重 20 克左右。

动物称重后, 按不同处理组随机分配, 分为五组: 对照组, 受检药物低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照组。

(二) 给药方法以皮下埋植法为例加以说明: 各组动物皮下埋植 IdUrd 药片 (剂量为 0.75 克/公斤体重), 同时在背部皮下注入 10% 的酵母浸出液 0.2 毫升。阳性对照组动物腹腔内注射甲基磺酸甲酯 (剂量为 10 毫克/公斤体重)。

用药完毕, 各组动物放回饲养笼, 26 小时后, 腹腔注入秋水仙素 (剂量为 4mg/公斤体重) 处理 2 小时, 杀死动物, 取下股骨, 用纱布将腿骨外的肌肉剔除干净, 浸入盛有生理盐水的烧杯中。

(三) 骨髓细胞的制备: 用骨钳将大腿骨充分压碎, 用生理盐水洗出骨髓细胞, 自然沉降后吸出细胞悬浮液, 1000 转/分离心 7 分钟, 弃上清液, 留下骨髓细胞。

(四) 细胞学技术

1. 用 0.5% KCl 低渗液 7 毫升加入盛有骨髓细胞的离心管中, 用吸管缓慢冲打均匀, 放入 37 温箱低渗 20 分钟, 然后取出离心管, 以每分钟 1000 转离心 7 分钟。

2. 用甲醇、冰醋酸 3 : 1 配制的固定液固定细胞, 15 分钟后离心, 换一次固定液, 在室温中搁置 15 分钟, 离心, 收集细胞, 制备细胞悬浮液。

3. 将细胞悬浮液滴在清洁的载玻片上, 放在 37 温箱中过夜。

(五) 后处理: 染色体标本平放在 45—48 恒温水浴锅的平面上, 玻片上滴加一层 $2 \times$ SSC 溶液, 用 15W 紫外灯照射 30 分钟, 灯管距离标本约 6 厘米。然后用磷酸缓冲液慢慢洗去标本上的 $2 \times$ SSC, 用 Giemsa 染色, 制成的标本片即可用来观察姊妹染色单体交换图像 (图 22-1)。

七、实验结果

1. SCE 的计数方法

观察时选择细胞轮廓完整, 染色体为 $2n=40$ 的色差清晰的中期分裂相计数。染色单体端部和着丝粒之间的互换计作一个 SCE, 染色单体中间的互换计作二个 SCE。

小鼠骨髓细胞 SCE 数据

组别	供试小鼠数	观察小鼠数	姊妹染色单体互换 (SCE)				
			总数	平均	范围	t 值	p 值
对照							
低剂量组							
中剂量组							
高剂量组							
阳性对照							

2. 统计学处理

(1) 分别算出各组的 SCE 平均值 \bar{x} 和标准误 $S_{\bar{x}}$ 。

SCE 平均值：

$$\bar{x} = \frac{\text{SCE 总数}}{n} \quad (n \text{ 为细胞数})$$

标准差：

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{\sum x^2}{n}}{n-1}}$$

标准误：

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$$= \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{\sum x^2}{n}}{n(n-1)}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

得出五组 SCE 平均数和标准误

对照组 $\bar{x}_A \pm S_{\bar{x}_A}$

低剂量组 $\bar{x}_B \pm S_{\bar{x}_B}$

中剂量组 $\bar{x}_C \pm S_{\bar{x}_C}$

高剂量组 $\bar{x}_D \pm S_{\bar{x}_D}$

阳性对照组 $\bar{x}_E \pm S_{\bar{x}_E}$

(2) t 测验

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{\sum (x_A - \bar{x}_A)^2}{n_A(n_A - 1)} + \frac{\sum (x_B - \bar{x}_B)^2}{n_B(n_B - 1)}}}$$

$$= \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{S_{\bar{x}_A}^2 + S_{\bar{x}_B}^2}}$$

查表求 p 值如 $P > 0.05$ 表明差异不显著，可以认为药物无毒性； $p < 0.05$ 差异显著，可以认为药物有毒性。

(吕群)

实验二十三活体精原细胞姊妹染色单体色差方法

一、实验原理

环境中污染因子的遗传学效应，是通过生殖细胞传递的。所谓生殖细胞是指从原生殖细胞(primordialgermcells)及其分化的一系列细胞，所以既包括性原细胞(gonocytes)，也包括性母细胞和配子等。当生殖细胞中的DNA，受到污染因子的影响而损害后，往往引起基因突变或染色体畸变，结果使后代个体出现形态变化和功能异常，造成遗传上的危害。

目前认为SCE可以反映DNA损伤，所以在小鼠精原细胞有丝分裂的两个周期，即54—60小时中，不断掺入BrdUrd或IdUrd，使其染色体DNA在结构上有了差异，通过分化、染色处理，可以得到染色深浅不同的两条姊妹染色单体，从而可用来检测药物对生殖细胞的诱变作用。

二、实验目的

- 1.掌握实验方法并制备出精原细胞SCE标本。
- 2.通过显微镜观察，选择染色体色差清晰，分散度好的中期相进行显微摄影。实验组和对照组各一张。
- 3.记录各组(对照组、用药组、阳性对照组)SCE数据并进行统计学处理。

三、实验材料

6—8周龄的纯种雄性小鼠，体重20—25克。

四、实验器具和药品

1.用具：剪刀，镊子，止血钳，手术用针和丝线，内径为0.5厘米的压片机，研钵，培养皿，烧杯，量筒，离心管，吸管，注射器，玻片，试剂瓶等。台称，分析天平，离心机，恒温箱，恒温水浴锅，紫外灯，显微镜。

2.药品：0.85%氯化钠，1毫克/毫升的秋水仙素，6—12微克/毫升胶原酶，0.4%氯化钾，甲醇，冰醋酸，无Ca²⁺和Mg²⁺的Dulbecco's缓冲液，0.1%胰蛋白酶，小牛血清，0.075mol/L氯化钾，0.3%姬姆萨染液，pH6.8磷酸缓冲液等。

五、实验说明

1.利用国产的胶原酶做低渗前的预处理，使曲精细管结缔组织疏松，生殖细胞容易脱离生精上皮而悬浮于处理液中，制片后，精原细胞分裂相比未经胶原酶处理的增加5—10倍。

曾用不同的胶原酶浓度(6、12、24、48、96微克/毫升)和不同处理时间(10、20、30分钟)进行过比较，结果表明，6—12微克/毫升，37℃中处理20分钟较为适宜，过高浓度的胶原酶溶液或过长时间的处理，均可能使细胞受到破坏，反而达不到预期的效果。

2.压制IdUrd时，压力要适当，压力小，药片松散，手术时易破碎；压力过大，药片太板结，埋植后动物难于吸收。

3.埋植药片时，用手术小剪刀在实验动物腹部开一小口后，用止血钳剥离局部区域的腹膜时，要小心谨慎，切勿使腹膜损伤。

4.用活性炭吸附BrdUrd悬液注入法时，发现小鼠睾丸表面均吸附一层活性炭，表明吸附有BrdUrd的活性炭注入体内后，通过腹股沟管进入睾丸的鞘膜腔，从活性炭缓缓释放出来的BrdUrd通过扩散透入睾丸膜，由睾丸动脉吸收进入睾丸，并在降解之前运转至精原细胞，因而只需注射一次，精原细胞的染色体即能标记上BrdUrd。其他远离腹腔的组织如骨髓、腮腺等，要加大

BrdUrd 剂量或注射两次，其染色体上才能标记上 BrdUrd。

六、实验步骤

(一) 将成熟的雄性 ICR 小鼠，6—8 周龄，体重 20—25 克，随机分为对照组、试验物质高、中、低剂量组及阳性对照组。

被试物质的剂量标准（高、中、低三个剂量组）、给药途径，用药时间以及溶剂等参照活体骨髓细胞 SCD 方法中实验步骤一节。

阳性对照组用药方法亦在活体骨髓细胞 SCD 方法中有详细介绍。

(二) 每组小鼠腹股沟皮下埋植 5-碘脱氧尿苷 (IdUrd) 片 (2 克/公斤体重) 或腹膜内注射吸附有 BrdUrd 的活性炭悬液 (BrdUrd10mg/活性炭 100 毫克/毫升) 0.5 毫升。

IdUrd 药片的制备以及 BrdUrd 的活性炭悬液的处理可参照活体骨髓细胞 SCD 方法。

(三) 供试动物在给 IdUrd 或 BrdUrd 之后 58—60 小时处死，取出睾丸。处死前 4 小时，腹腔注射秋水仙素 (4 毫克/公斤体重)。阳性对照组在给 IdUrd 或 BrdUrd 28 小时腹腔注入阳性诱变剂，处理 30—32 小时。

(四) 取出的睾丸，用生理盐水洗去血液、脂肪，剥去外膜、充分剪碎、悬浮于 4 毫升 6—12 微克/毫升的胶原酶中，用滴管打匀，37℃ 预处理 15—20 分钟。即加入等量的 0.4% 氯化钾，离心 5 分钟 (1000 转/分) 弃上清液。

或将剪碎的睾丸，悬浮于无 Ca 离子和 Mg 离子的 Dulbecco's 缓冲液中。离心收集组织碎片，用 0.1% 胰蛋白酶 37℃ 处理 10 分钟。然后加入几滴未灭活的小牛血清使胰蛋白酶失活后，离心收集细胞。

(五) 用 0.4% 氯化钾溶液低渗 30 分钟，离心弃上清液，加 4 毫升甲醇：冰醋酸 (3：1) 固定 5 分钟，用滴管轻轻冲吸，待自然沉降后吸取上层细胞悬液，重复三次，离心后，按常规气干法制片 (见图 23-1)。

(六) 姊妹染色单体分化染色，方法参照活体骨髓细胞 SCD 法。这里从略。

七、实验结果

1. 显微镜观察，记录各组 SCE 数据：

小鼠精原细胞 SCE 数据

组别	供试小鼠数	观察细胞数	姊妹染色单体互换 (SCE)		
			总数	平均	t 测验
对照					
低剂量组					
中剂量组					
高剂量组					
阳性对照组					

2. t 测验 (参阅实验二十一的统计学处理)。

(吕群)

参考文献

实验二十四二倍体细胞株培养

一、实验原理

把哺乳类动物和人体细胞自机体取出，放在玻璃培养瓶中，选择和控制某些外界条件，使细胞在离体条件下继续分裂生长。现在体外培养技术，已广泛应用于生理学、免疫学、病毒学、遗传学等方面，对细胞分化、发育、肿瘤发生以及染色体研究等领域起着很大的作用。

二、实验材料

鼠胎的肺、肾、肝、皮肤。

三、实验器具和药品

1.用具：培养瓶（30 毫升），移液管（1 毫升，5 毫升，10 毫升），滴管，培养皿（100 毫米），小指管（10 毫升），白细胞计数板，直柄虹膜剪、虹膜镊（直、弯），解剖镊（尖端内面有齿），白内障刀，分离针，动脉钳，止血钳，白瓷盘，光学显微镜，倒置显微镜，隔水式培养箱，蜡板一块，离心管。

2.药品：Hanks 液，Trypsin-EDTA 液，RPMI1640，DMEM0.5%水解乳蛋白，M199，秋水仙素，低渗液，Giemsa，青霉素，链霉素，甲醇，冰醋酸，pH6.8PBS。

四、实验说明和步骤

（一）原代培养：取怀孕 18 天的大白鼠胚胎。

1.用铁棒敲击大白鼠的头致死，四肢钉在蜡板上。

2.用 70%酒精棉球擦遍腹部，然后用一薄层浸透 70%酒精的棉花覆盖在腹部。

3.到准备室中剪开腹部表皮，打开胸腔。

4.剪开内皮，取出胚胎，去外膜，把胚胎放在培养皿中。

5.进入无菌室，用 Hanks 液洗胎鼠数次，再剖开胎鼠胸腹腔，剪取肝、肾、肺。从胎鼠体表剪取皮肤。

6.所取的组织用 Hanks 液洗 3 次。然后用虹膜剪刀，将组织剪碎成 1—2 毫米大小的块，再用 Hanks 液洗 3 次，加入各种培养液，含有 30%小牛血清及 200 单位/毫升青霉素，链霉素，pH6.8，洗 2 次。肺组织用 DEME、肾组织用 0.5%水解乳蛋白，肝组织用 RPHI1640，皮肤组织用 M199。

7.用滴管将组织块吸入培养瓶中，并均匀分散贴在瓶壁上，组织块数可多些，吸去多余的液体。放在 37 温箱中 2—4h，然后加入培养液 0.5 毫升，轻轻地使组织块浸入培养液，置 37 温箱静止培养。隔三天换一次培养液。

8.过 3 天，皮肤组织四周展现出细胞。过 7 天，肺和肾组织四周展现出细胞。14 天后，肝组织四周展现出细胞。

（二）传代培养

1.待组织块四周的细胞密集、组织块之间细胞铺满瓶壁，吸去培养液，加入 1 毫升 Trypsin-EDTA 液 pH7.8 洗一次，然后在室温中让细胞浸在 1 毫升 Trypsin-EDTA 液中 1—2 分钟，把瓶子翻过来观察。若细胞呈白色一片，而且细胞间出现针孔状时，可倒去 Trypsin-EDTA 液，再使细胞在室温中静止 3 分钟，轻轻拍打瓶壁，组织块和细胞很均匀地脱离瓶壁。

2.加入 4 毫升培养液 pH7，使滴管不离液面进行吹打，使细胞呈均匀的单细胞，静止片刻，用滴管吸取细胞悬液移入另一只培养瓶，放入 37 温箱培养。留下组织块再分散贴在原瓶壁上，继续培养以备后用。

3.传代细胞一般三天后会在培养瓶壁上铺满，再传代，一瓶分传二瓶，接着可进行染色体制备。

（三）染色体制备

1. 传代后第二天，在倒置显微镜下观察，细胞之间有空隙，但并不很稀疏，有许多呈气球状透亮的圆细胞，这时相当于生长对数期。

2. 加秋水仙素，浓度为 2—0.2 微克/毫升，处理 4 小时，中断纺锤丝形成，从而使细胞停留在分裂中期。

3. 倒去培养液，加入 Trypsin-EDTA 液，操作步骤同细胞传代，待细胞从培养瓶瓶壁上分离下来。立即加入 8 毫升 0.075mol/LKCl 低渗液，用滴管吹打细胞使其分散，置 37℃ 低渗处理 30 分钟。低渗处理使细胞因内外渗透压不同而膨胀。

4. 低渗后在细胞悬液中加入 0.5—1 毫升固定液(3 份甲醇和 1 份冰醋酸)，吹打一下，可以防止继续低渗及细胞成团，立即离心 1000 转/分，经 5 分钟。

5. 去上清液，加入 0.3—0.5 毫升固定液，用滴管打散细胞，固定 15 分钟，如此离心固定重覆二次。

6. 去上清液，加入 0.3—0.5 毫升新鲜固定液，制成细胞悬液。

7. 气干法制片，用 pH6.8PBS 配制 5%Giemsa 液染色。

8. 显微镜下检查，挑选分散良好，染色清晰的图像摄影，进行核型分析。也可将片子进行染色体分带染色，以作进一步研究。

(四) 细胞冻存：正常离体细胞培养，细胞存活有一定的世代，一般传代到 30—50 代就老化衰亡。同时为了减轻工作量，防止细胞变异，可将细胞冻存起来。

1. 冻存细胞的培养方法与传代培养相同。待细胞长成单层，略密些，加入 Trypsin-EDTA 1 毫升洗一下，然后在室温中让细胞浸在 1 毫升 Trypsin-EDTA 中 1—2 分钟，在瓶壁上观察到细胞呈白色一片，并有针孔状，立即将消化液去干净，尽量不留，仍在室温中放置片刻，用手轻轻拍打瓶壁，细胞均匀地滑下。

2. 冻液的配制，60% 培养液 + 30% 小牛血清 + 200 单位/毫升的青霉素、链霉素 + 10% 二甲基亚砷 (DMSO, 法国制)，细胞成活率达 90% 以上，pH7.0。每小瓶细胞加入 2 毫升冻液，用滴管轻轻吹打细胞，以免很多气泡产生，因为过多气泡会损害细胞，另外会破坏血清中蛋白质的成分。

3. 用滴管将含有细胞的冻液吸入 2 毫升安瓿瓶，每只安瓿瓶放 1.5 毫升细胞悬液，过多的细胞悬液冻存时会引起安瓿瓶炸裂。用火焰封口，务须封好瓶口，否则冻存时和复苏时也会发生炸裂现象。

4. 将安瓿瓶放在 4℃ 冻箱中 4 小时。

5. 置安瓿瓶于气态氮中 20 分钟，然后立即放入液态氮中。

6. 复苏时将安瓿瓶自液氮中取出，立刻放在 40℃ 温水中，使其在 1 分钟内溶解，然后在无菌室中打开安瓿瓶，用滴管吸取细胞悬液放入培养瓶中，然后加入含有小牛血清的培养液，一只安瓿瓶培养一瓶。第二天细胞贴壁生长，将含有冻液的培养液换成新鲜培养液。因为二甲基亚砷具有防止细胞受冻损伤的作用，但在细胞存活培养时，会引起毒害作用，从而导致细胞变异，因此必须待细胞贴壁生长后及时换液。

五、实验结果

哺乳类和人体机体上各种组织，经过离体细胞培养后可以建立各种类型正常细胞株，如肝、肾、皮肤、脑等等。经过病毒转化，还可建立淋巴细胞株。有利于对真核细胞进行发育和分化分析，也有利于对人体遗传疾病的研究，如利用离体培养细胞，进行酶的研究比在人体中研究酶要方便得多。建立的

细胞株可以运输到世界各地的实验室进行研究。若是病人细胞在体外培养建立了细胞株冻存起来，即使该病人死亡，也可以对该病的病因进行研究。为此二倍体细胞培养的技术，对于真核细胞遗传学的研究，有其特殊有用的地方，特别是为真核生物分子遗传学研究提供了原材料。

六、问题

- 1.原代培养过程中，组织块贴壁时 pH 应低一些，待细胞生长密集后 pH 要相应提高，那是为什么？
- 2.染色体制备过程中，为什么用甲醇和冰醋酸来固定细胞？

参考文献

(邱信芳)

实验二十五单细胞克隆的分离

一、实验原理

运用经过自然和人工转化的哺乳动物细胞，采用与微生物相似的途径，进行单细胞培养和分离，由此建立一个简单、快速、可靠的方法，使单细胞培养形成克隆群体，以供细胞纯化、突变细胞株的选择、识别和分离，可为细胞融合提供原始材料。

二、实验材料

中国仓鼠 (Chinese hamster) 肺细胞 Wg3-h. 卵巢细胞 CHO-K1.

三、实验器具和药品

- 1.用具：培养瓶 (30 毫升)，培养皿 (35 毫米)，移液管 (1 毫升，5 毫升，10 毫升)，滴管，倒置显微镜，CO₂ 培养箱，白细胞计数，玻璃铅笔，玻璃圆环或铝制圆环。
- 2.药品：PRHI-1640，F₁₂，小牛血清，青霉素，链霉素，Trypsin-EDTA 液。

四、实验说明和步骤

- 1.活化亲本细胞，将亲本细胞用 Trypsin-EDTA 液消化再接种，第二天细胞生长进入对数期，在倒置显微镜上看到细胞生长旺盛，有许多透亮圆形的分裂细胞，即可供本实验用。
- 2.将亲本细胞用 Trypsin-EDTA 液消化使成单细胞分散在培养液中 (RPMI 或 F₁₂，含 10% 小牛血清及 200 单位/毫升青霉素、链霉素，pH6.8)。
- 3.计数细胞，要求每毫升 1×10^2 细胞。
- 4.接种 1 毫升细胞悬液在 35mm 培养皿中，同时加入 2 毫升培养液。
- 5.置 37 °C CO₂ 培养箱培养 7—10 天，细胞生长会放出 CO₂。若接种细胞数少，放出 CO₂ 也少，培养液的 pH 就会升高，超过 6.8 甚至 7.8，不利于细胞生长，放在 CO₂ 培养箱中有利于稳定培养液的 pH。
- 6.正常细胞生长过程中有接触抑制，细胞不会形成堆叠形，而长期体外培养的细胞，由于受到病毒感染，培养条件的影响，如营养成分、血清，pH 以及一些未知的原因，会发生变异，这些变异的细胞株，会失去接触抑制的特性，而形成堆叠形的细胞克隆。单细胞经过培养后，在培养皿中可以用肉眼看到一个大小不等的细胞克隆 (见图 26-1, F)，然后在倒置显微镜下检查，用玻璃铅笔将没有细胞混杂的细胞克隆圈出来。
- 7.在细胞克隆上，放一个玻璃圆环 (用 Cello-胶粘住)，在环中注入 Trypsin-EDTA 液 2—3 分钟后，用滴管在环中吹打，吸出 Trypsin-EDTA 细胞悬液滴入含有 3 毫升培养液的培养皿或培养瓶中。

8. 一个克隆的细胞数往往会超过几百个，仓鼠细胞生长速率一般是每 12 小时分裂一次，在小培养瓶中细胞本身放出的 CO_2 足够调节 pH，所以将细胞放在 37 隔水式温箱中，也会很好地贴瓶生长。但生长周期长的细胞如人体、小鼠细胞还是适宜于培养在 CO_2 培养箱中。

9. 细胞生长到一定密度，用 Trypsin-EDTA 液消化，分到 2—3 只培养瓶培养。

10. 染色体检查同二倍体细胞周期的染色体检查。

五、实验结果

哺乳动物细胞通过分离，稀释接种，培养在适宜于单细胞生长的培养液中，形成细胞克隆。运用这项技术可以制作细胞成活的曲线，即在接种相同数量细胞的培养瓶中，加入不同浓度的化学药品，或照以不同剂量的射线，观察其对细胞损害的程度。由此可以在哺乳类细胞中进行诱变试验及分离突变细胞。为在真核细胞中进行毒理学和细胞融合提供实验手段及材料。

六、问题

1. 为什么要活化亲本细胞？
2. 单细胞克隆为什么有大有小？

参考文献

(邱信芳)

实验二十六染色体分化染色技术

一、实验原理

自 1956 年 Tjio (庄有兴) 和 Levan 确定人类染色体数目为 46 个后，1959 年，在 Denver 染色体命名会议上，把人的 46 个染色体分为 7 个群。但对识别每一个染色仍有很大困难，尤以 C 组更难区别。1970 年，发现染色体分化染色，并于 1971 年召开了国际性巴黎会议，为 G、Q、C 和 R 带四种分带技术建立了命名法。以后又逐步建立了 Giemsa11 分化染色法及染色体脆性位点显示法。为染色体遗传病诊断、杂种细胞检定、特殊细胞株标记、染色体的识别等开创了一系列检测方法，大大加速了染色体研究的进展。

二、实验材料

体细胞培养后制备的染色体标本；淋巴细胞培养后制备的染色体标本。

三、实验器具和药品

1. 用具：离心管、离心机，天平，37 隔水式温箱，载玻片，盖玻片，恒温水浴锅，8W 紫外灯，光学显微镜，标本板，玻璃铅笔，定时钟，染色缸，直柄虹膜镊，滴管。

2. 药品：甲醇，冰醋酸，KCl，pH6.8，PBS，Trypsin，ICN 液，GKN 液，Giemsa，pH11.0 $0.05\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ ，氨甲喋呤 (Amethopterin)，5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，5-氟脱氧尿嘧啶核苷 (FUdR)，M199，RPMI1640，小牛血清，透析小牛血清，青霉素、链霉素，秋水酰胺 (colcemid)，Hoechst-33258。

四、实验说明及步骤

(一) G 带技术

1. 试剂

(1) 固定液：3 份甲醇，1 份冰醋酸 (新鲜配用)。

(2) pH6.8 PBS：溶液 A—— $0.1\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ ，溶液 B—— $0.1\text{mol/L NaH}_2\text{PO}_4$ 。

pH6.8PBS 为 49.1 毫升 A 液加 50.9 毫升 B 液。

(3) pH7.0ICN 液：NaCl 0.80 克、KCl 0.02 克、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.30 克、 KH_2PO_4 0.02 克、蒸馏水 100 毫升。

(4) pH7.0GKN：葡萄糖 0.10 克、KCl 0.04 克、NaCl 0.80 克、 NaHCO_3 0.035 克、蒸馏水 100 毫升。

(5) 0.25% Trypsin 溶液：250 毫克 Trypsin 溶于 100 毫升 ICN 液中。

2. 显带步骤

(1) 将新制备没有细胞质、染色体分散好的染色体标本以 5% Giemsa 液（蒸馏水配制）染色 5 分钟，将标本放入蒸馏水中漂洗。这种染过色的标本，至少可保存一周而不影响显带效果。

(2) 制备 G 带前一天，将染过色的标本用固定液脱色 5 分钟，置 60℃ 烘箱中 16—24 小时。

(3) 取烘过的标本置预热到 37℃ 的 0.25% Trypsin 液中 0.5—1 分钟（处理时间随气温和标本龄而变动）。立即放入 GKN 液中漂洗 15 秒钟。

近年来的研究表明，染色体标本放到 37℃ Trypsin 中是 G 带显示的一种预处理方式，它可以从染色体上抽取蛋白特定的组成部分。Giemsa 染料是噻嗪-曙红染料，染色首先取决于二个噻嗪分子同 DNA 结合，在此基础上它们结合一个曙红分子，其次取决于一个有助于染料沉淀物累积的疏水环境。通过 Trypsin 预处理可以使阴性 G 带区的疏水蛋白被除去或使它们的构型变为更疏水状态。由此可见在 G 显带中抽取的蛋白往往是疏水的，而且主要来自阴性 G 带区。

(4) 然后用 pH6.8PBS 配制 5% Giemsa 液，染色 10—20 分钟，放入蒸馏水中漂洗数次，空气干燥。

(5) 镜检：在显微镜高倍目镜下检查显带标本（见图 26-1, A），在染色体上若出现清晰的深浅相间的带型，即为可取标本，可供摄像分析。若观察到染色体变粗并显得毛糙边缘，有时甚至呈糊状，那可能是预处理过度了。

(二) C 带技术

1. 试剂

(1) 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水溶液： $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5 克，蒸馏水 100 毫升。

(2) $2 \times \text{SSC}$ 液：NaCl 1.75 克，柠檬酸三钠 0.082 克，蒸馏水 100 毫升。

2. 显带步骤

(1) 取 5—7 天标本龄的染色体标本，选择染色体分散度好，没有细胞质的标本在 0.2mol/L HCl 中室温下，处理 1 小时，然后水洗。这一程序酸的预处理是使 DNA 脱嘌呤，但没有 DNA 骨架的断裂。

(2) 将标本浸于 50℃ 的 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液中，10 秒至几分钟（随气温和标本龄而变动），水洗。碱性处理可能通过产生一个高水平的 DNA 变性，促进继发的 DNA 溶解。

(3) 在 60℃ 的 $2 \times \text{SSC}$ 液中处理 1 小时，水洗。 $2 \times \text{SSC}$ 温育，使 DNA 骨架断裂并使断片溶解。

(4) 用 pH6.8PBS 配制 5% Giemsa，染色 10 分钟，水洗，空气干燥。C 显带的基本特征是从染色体臂选择性地抽取 DNA，而 C 带区 DNA 对抽提有较大的抗性，从而保留了一部分 DNA，因此可以使用 Giemsa 染料显示出 DNA 的不同分布。

(5) 镜检：在显微镜高倍目镜下检查显带标本（见图 26-1, B），如着丝粒区域或异染色质部位、次级缢痕部位及 Y 染色体深染，染色体其它部位染不上色，即为可取标本，若观察到染色体均呈白色，那么，可能是碱处理或 $2 \times \text{SSC}$ 温育过度了。

(三) R 带技术

1. 试剂

(1) pH6.8PBS：溶液 A —— $1/15\text{mol/LKH}_2\text{PO}_4$ 、溶液 B —— $1/15\text{mol/LNa}_2\text{HPO}_4$ 。pH6.8PBS 为 1000 毫升 A 液加 900 毫升 B 液。

(2) Earles 液：溶液 A—— NaCl 6.80 克、 KCl 0.40 克、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.14 克、蒸馏水 800 毫升。

溶液 B——无水 CaCl_2 0.20 克、 $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.17 克、蒸馏水 200 毫升。

将溶液 A 倒入溶液 B 中，混合后即可。

(3) Hoechst-33258 原液：Hoechst-33258 毫克，蒸馏水 4 毫升。

Hoechst 工作液：200 毫升 $1/15\text{mol/LPBS}$ 加 0.75 毫升原液。

(4) 吖啶橙 (acridineorange)

配制 pH6.5PBS：

溶液 A—— $0.07\text{mol/LNa}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、溶液 B—— $0.07\text{mol/LKH}_2\text{PO}_4$ 。将 32 毫升 A 液和 68 毫升 B 液混合。

吖啶橙工作液：0.1 克吖啶橙于 100 毫升 0.07mol/LPBS 中。

(5) 胸腺嘧啶核苷 (Thymidine)：使最终浓度为每毫升为 0.3 毫克。

(6) 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)：使最终浓度为 $3 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 。

2. 标本制备——细胞同步化培养

人体培养细胞在培养瓶中汇合三分之二时，淋巴细胞培养至 72 小时，加入胸腺嘧啶核苷，最终浓度为每毫升 0.3 毫克。继续培养 17 小时，用 Hanks 液清洗 2 次，加入新鲜培养液，淋巴细胞换入的培养液中仍需含有 PHA，同时加入 BrdU，最终浓度为每毫升 10 微克。置 37 温箱中再培养 5 小时，加入秋水酰胺，最终浓度为每毫升 0.07 微克，在 37 中处理 2 小时，常规染色体制片，镜检时，可看到很多染色体分散的核型，且染色体形态均较细长，有利于提高显带效果。

细胞同步化是由于过量的胸腺嘧啶核苷会使细胞周期停留在 S 期。经过 17 小时的同步化，解除后大多数细胞都迅速起步完成 S 期，随即进入 G_2 期直至 M 期。因此控制秋水酰胺处理时间，可以得到细长染色体，进行高分辨率的显带分析。

3. 显带步骤

(1) 所制标本在 Hoechst 工作液中，浸染 20 分钟或在吖啶橙工作液中浸染 5 分钟，再用 PBS 冲洗 2 次。

在同步化培养细胞时，进行 BrdU 处理，使 BrdU 在 DNA 复制时渗入到胸腺嘧啶的位置，又因 BrdU 是一种淬灭剂，凡有 BrdU 的区域都能使吖啶橙和 Hoechst 荧光染料减弱，这对于显带清晰有帮助。

(2) 标本上铺满 $1/15\text{mol/LPBS}$ ，放在 45 铁板上，用 8W 紫外灯，灯距为 5 厘米，照射 15—20 分钟后，蒸馏水洗 2 次。

紫外光的照射造成邻近胸腺嘧啶形成二聚体，即 TT，这样减少了 AT 间的氢键，使富于 AT 的 DNAT_m 值下降，也就是这部分的 DNA 更易变性。

(3) 标本在 86℃ 水浴锅中的 Earles 液中处理 1—2 分钟后，蒸馏水洗 2 次。处理时间和气温及标本龄、光照有关。

R 显带过程中的热处理是重要的步骤，86℃ 是适宜的温度，使富于 AT 的 DNA 变性而使富于 GC 的 DNA 保持原状。

(4) 用 pH6.8PBS 配制 5%Giemsa 染色 5—10 分钟，水洗，空气干燥。

(5) 在显微镜高倍目镜下检查显带标本（见图 26-1, C），R 带是与 G 带相反的带型，R 带是富于 GC 碱基对的 DNA，是 S 期早复制的 DNA，而其带间是富于 AT 碱基对的 DNA，是 S 期晚复制的 DNA。在显微镜下可以看到比 G 带更明显的带型，另外大部分染色体端部为深染，还有若两条 X 染色体中的一条为晚复制时，呈淡染。这对于染色体间易位和对 X 染色体失活和晚复制关系的研究将有独特的功能。若在显微镜下呈现一片淡染，可考虑光照时间和处理时间两者之比例。

(四) 染色体脆性位点显示技术

1. 试剂

(1) 培养液：93 毫升 mol/L199 + 5 毫升透析小牛血清 + 1 毫升 2mol/LHepes + 1 毫升 10^{-5} mol/LFUdR + 2×10^4 单位青霉素、链霉素，pH7.6—7.8。

(2) 氨甲喋呤 (amethopterin)，使最终浓度为 10^{-7} mol/L。

(3) BrdU，使最终浓度达 3×10^{-5} mol/L。

(4) 秋水酰胺，最终浓度为每毫升 0.07 微克。

2. 标本制备：人体培养细胞在培养瓶中汇合三分之二时，淋巴细胞培养至 72 小时，加入氨甲喋呤，最终浓度为 10^{-7} mol/L，继续进行同步化培养 17 小时，用 Hanks 液清洗 2 次，加入新鲜培养液，在淋巴细胞换入的培养液中仍需含有 PHA，但在换入培养液去掉 FUdR，而加入 BrdU，最终浓度达 3×10^{-5} M，继续培养 5 小时，随即加入秋水酰胺，最终浓度为每毫升 0.07 微克，2 小时后按常规收细胞，空气干燥制片。

3. 显示脆性位点：用 pH6.8PBS 配制 3%Giemsa 染色 10 分钟，水洗，空气干燥。

4. 镜检：在显微镜高倍目镜下观察 100 个分裂中期有 3—30 个染色体上发现有脆性位点（见图 26-1, D），主要特征为具有宽度不等的非染色裂隙，常涉及两个染色单体，此外，可出现无着丝粒片段、缺失以及三相交换体征象 (friradialfigure)。

脆性位点可能是富含胸腺嘧啶的 DNA 节段，因此当脱氧胸苷三磷酸库 (dTTP) 耗竭时，可造成这一节段在有丝分裂时不能紧密折叠，甚至出现裂隙或断裂，表现出镜下可见的脆性位点。如在细胞培养液中去除叶酸和胸腺嘧啶，或加入二氢叶酸还原抑制剂（如氨甲喋呤）和 5-氟脱氧尿嘧啶核苷 (FUdR)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，可使脆性位点细胞表达频率明显增高，说明脆性位点的产生与 DNA 的这一合成代谢过程受阻有关。此外培养液的 pH 对提高脆性位点的检出率是非常重要的。因为在不同 pH 条件下，叶酸具有不同的离子形式，其进入细胞的运转速率也就不同，而胸腺嘧啶的摄入同样受 pH 的影响，因此在选择适当培养液的同时注意 pH 的影响。

(五) Giemsa11 分化染色技术

1. 试剂

(1) Giemsa 原液制备：1 克 Giemsa 放在圆底试管中，加入 6 毫升 60℃ 纯甘油，再加入 60 毫升未加温的纯甘油，用锡纸封口，在室温中振荡 1 小时。

将管子移到 60℃ 水浴中振荡过夜。待稍冷后加入 66 毫升纯乙醇，在室温中振荡 2—3 小时。将此原液保藏在棕色瓶中。

(2) pH11.3, 0.05mol/LPBS :

用 17.5 毫升 1mol/LNaOH 调整 0.05mol/LNa₂HPO₄ 的 pH，使成为 pH11.3。

2. 标本制备

常规制片，细胞悬液滴片时为一般片的 1/3 密度。用乙醇-0.2mol/LHCl 洗一下标本。

3. 显色过程

(1) 标本浸在 60℃ 蒸馏水中 2 小时。

(2) 制备染色液，47 毫升 pH11.3, 0.05mol/LPBS + 3 毫升 Giemsa 原液，混和后用滤纸过滤，在 37℃ 水浴锅中预温。

(3) 标本浸到 37℃ Giemsa 染液中 1—6 分钟、标本龄长时适当延长染色时间。

(4) 镜检：在显微镜高倍目镜下观察，灵长类的染色体呈现淡蓝色（见图 26-1, E），伴有一些特定的异染色质呈品红色。啮齿类染色体会被染成品红色。

G11 显带在某些方面是 C 显带的一个类型，而且灵长类确实显示了异染色质的一个亚型。

五、实验结果

通过染色体分化染色，可以在染色体上显示出各种带型及脆性位点，有利于对染色体遗传病的诊断，尤以 X 染色体长臂末端 2 区 7 带和 2 区 8 带之间或附近的一个特定脆性位点，它表现了非特异性 X 连续的智力低下，被称为脆性 X 染色体综合症，可以给予叶酸治疗，这一发现将会使许多不明原因的智力低下患者得以诊断和治疗。Giemsa11 带又可用于人类细胞和啮齿类细胞融合后所得杂种细胞的检定。再者染色体分化染色一般被认为是 DNA 与蛋白质的相互作用，而且显带是一种染料特异现象，为此染色体分化染色不仅是一个具有巨大价值的实用手段，而且对染色体组成的特定水平也将提供重要资料。

六、问题

1. 在染色体分化染色过程中最关键的一步在那里？

2. 体细胞领域中染色体分化染色除应用于染色体遗传病的诊断，杂种细胞的鉴定外还可应用于哪些方面？

参考文献

(邱信芳)

实验二十七体细胞融合及选择、鉴定技术

一、实验原理

体细胞融合现象的发现，改变了原来只可在同一物种成员间进行交配并生殖的经典遗传学研究方法。体细胞融合可在不同种、不同属，甚至更远的机体之间进行，因此有可能把远缘种的遗传物质引入特定细胞中，制备出很多遗传上不同的基因组。现在体细胞融合技术已用于体细胞遗传学的各种实验，为研究基因和染色体行为提供了丰富的机会。

二、实验材料

中国仓鼠细胞 (Chinese hamster) 肺细胞 Wg3-h

卵巢细胞 CHO-K1

人体淋巴细胞 (lymphocyte)

三、实验器具和药品

1.用具：培养瓶 (30 毫升)，移液管，滴管，培养皿 (35 毫米)，倒置显微镜，光学显微镜，隔水式温箱，白细胞计数板，玻璃铅笔，圆底离心管，离心机 (4000 转/分)，粗天平，8W 紫外灯，水浴锅。

2.药品：RPMI1640，F₁₂，小牛血清，青霉素、链霉素，Trypsin-EDTA 液，白细胞分离液，融合缓冲液 (PFBS)，0.15mol/LHepes，HAT 选择培养液，GKN 缓冲液，聚乙二醇 (PEG)，仙台病毒 (Sendaivirus)，Hanks，salineG。

四、实验说明和步骤

(一) 试剂

1.培养液：RPMI1640 (或 F₁₂) + 10%小牛血清 + 200 单位/毫升青霉素、链霉素，pH7.4。

2.白细胞分离液——tris-ammoniumchloride

(1) 0.83%NH₄Cl：7.47 克 NH₄Cl 溶解于 900 毫升三重蒸馏水中。

(2) tris：2.055 克 tris 溶解于 100 毫升三重蒸馏水中。用浓 HCl 调至 pH7.56。

(3) 将 (1) 液和 (2) 液混和，用浓 HCl 调至 pH7.2。高压灭菌。

3.病毒制备将病毒原液稀释 10⁻³ 后，取 0.2 毫升，接种在 9 天龄鸡胚中，34 培养 48 小时，置 4 24 小时，收取尿囊液。接着进行血凝试验，检查增殖后病毒的活力。无菌检验，检查整个接种过程是否染菌。融合效率测定，这一步骤很重要，有时病毒活力高，但融合效率不一定高。冻存，将经过三项检验的病毒悬液分装安瓿瓶，冻存于负 80 或液氮。

4.PEG (mw1000)

配制 50%PEG：称取 1 克 PEG，高压灭菌。待冷至 60 ，加入 1 毫升预温的 0.15mol/LHepes，用 50%NaOH 调至 pH7.6—7.8。

5.HAT 选择培养液

10⁻³mol/Lhypoxanthine

1.6 × 10⁻⁴mol/Lthymidine

4 × 10⁻⁷mol/Laminopterin

10⁻⁵mol/Lglycine

称好 H、T、G，加三重蒸馏水搅拌，然后加 A，灭菌过滤。

6.PFBS

(1) NaCl	8.00 克
KCl	0.20 克
Na ₂ HPO ₄	1.15 克
KH ₂ PO ₄	0.20 克
三重蒸馏水	800 毫升
(2) CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.17 克
三重蒸馏水	100 毫升
(3) MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10 克
三重蒸馏水	100 毫升
(4) 2mol/Lhepesbuffer	0.47 克/毫升
(5) phenol red	0.0012 克/毫升

工作液：(1) + (2) + (3) + 2 毫升 (4) + 1 毫升 (5) ，过滤灭菌。

7. salineG 缓冲液

(1) glucose	1.10 克
NaCl	8.00 克
KCl	0.40 克
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.29 克
KH ₂ PO ₄	0.15 克
三重蒸馏水	900 毫升
(2) phenol red	0.0012 克/毫升
(3) SolVI10 倍浓度	
MgSO ₄	1.54 克/1000 毫升
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16 克/1000 毫升

将上面两种浓液混和。

工作液：900 毫升 (1) + 1 毫升 (2) + 100 毫升 (3) ，8—10 磅湿热灭菌 30 分钟。

(二) 细胞融合 (见图 27-1 , A)

1. 仓鼠细胞 Wg-3h - - HGPRT-

细胞经 Trypsin-EDTA 消化、计数、得 1×10^6 细胞，加入 0.2 毫升 PFBS 成细胞悬液，置 4 待用。

2. 人体淋巴细胞在离体条件下不加 PHA 不会贴壁生长。

自人体抽取 3 毫升血样置圆底离心管，加入 15 毫升白细胞分离液，管口加盖，放在 37 水浴锅中 15 分钟，离心，1000rpm10 分钟，吸去上清液，如上述重复 2—3 次，至底壁有一层白细胞，加入 Hanks 液，计数，离心。加入 0.2 毫升 PFBS 使成细胞悬液，置 4 待用。

3. 病毒促融 (见图 27-1 , B、C)

(1) 病毒 0.2 毫升 (以融合率为依据用 PFBS 稀释) ，置预热 8W 紫外灯下，灯距为 5 厘米，灭活 3 分钟。

(2) 0.2 毫升 1×10^6 仓鼠细胞加 0.2 毫升 3×10^6 人体淋巴细胞，混合于圆底离心管中，然后加入 0.1 毫升灭活病毒悬液。置碎冰中 20—30 分钟，并不断振荡。后入 37 水浴锅中 30 分钟。

病毒促融因子主要在病毒外壳，是卵磷脂的作用，在 4℃ 中细胞被病毒吸附和凝集，在 37℃ 中病毒颗粒吸附部位细胞膜受到损伤，细胞之间穿孔，接着细胞损伤部位修复，使相邻近细胞相互连接，随后球形细胞形成。

4. PEG 促融

1×10^6 仓鼠细胞加 3×10^6 人体淋巴细胞混和置圆底离心管中，离心，1000rpm5 分钟，去上清液，用振荡器混和细胞，加入 0.5 毫升 50%PEG，迅速搅匀，约处理 30 秒，立即加入 10 毫升 GKN 缓冲液，离心，1000rpm5 分钟，如上述洗 2—3 次，加入完全培养基，分种细胞。

余下步骤同病毒促融。

近年来已广泛应用化学药物 PEG 进行促融，PEG 的作用是清除质膜的脂类保护衣，招致细胞紧密接触，脂类分子重排促使胞质的合并，最后稳定已合并的细胞。

(三) 杂种细胞选择

1. 细胞融合后，以 1×10^5 或 5×10^4 细胞数接种于小方瓶中。直接加入 HAT 选择培养液，若接种细胞数稀，死细胞不多，中间不用换液。置 37℃ 直至杂种克隆出现。也可在融合后，接种细胞于完全培养液中，生长二天后，换入 HAT 选择培养液。

由于 HAT 选择培养液中有氨基喋呤的存在阻断了核酸的从头合成，但正常细胞具有 HGPRT 酶和 TK 酶，可以利用外源的次黄嘌呤 (H) 和胸腺嘧啶核苷 (T) 合成核酸，由于 Wg3-h 细胞缺失 HGPRT 酶，在 HAT 选择培养液中不能生长，而人体淋巴细胞在体外又不能正常增殖，因此在 HAT 培养液中生长的只能是由人体淋巴细胞和中国仓鼠细胞形成的杂种细胞。

2. 按单细胞克隆分离法排选形态一致的克隆，培养在完全培养液中，传代后，一部分细胞冻存，一部分细胞进行生化及细胞学鉴定。

(四) 杂种细胞鉴定

1. Giemsa 11 分化染色

按染色体分化技术中的 Giemsa 分化染色步骤操作，在显微镜高倍目镜下初检有否差别染色出现，如果看到有淡蓝色的染色体和深品红色的染色体，可初步确定该克隆细胞为杂种细胞。

2. G 带鉴定

按染色体分化染色技术中 G 带技术操作，在显微镜高倍目镜下检查是否有人人的染色体，若有的，就可以进一步摄像，排队染色体，鉴别有哪几号人的染色体。

3. 酶的检定

(1) 样品制备

Trypsin-EDTA 消化细胞，加入 Hanks 液，离心，800rpm5 分钟。

去上清液，加入 2 毫升 Hanks 液，计数细胞。

分装细胞悬液在离心管中，每管 2—4 $\times 10^6$ 细胞，离心，800rpm5 分钟。

弃上清液，加入 0.75 毫升 salineG，在振荡器上搅匀细胞，移入 Eppendorf 离心管，离心，12000rpm2 分钟。

弃上清液，用滤纸尽量吸干，加 0.03 毫升三重蒸馏水，使最终细胞浓度为 10^8 /毫升。

用液氮或干冰和 37℃ 水浴进行细胞冻融，连续 3—5 次，在低倍目镜下检查，没有细胞形态，呈一片胞质，离心，12000rpm4 分钟。

取上清液作为电泳的样品。

(2) 醋酸纤维薄膜电泳 (cellogelelectrophoresis)

处理醋酸纤维薄膜

将 cellogel 置 30% 甲醇中保存, 用时取出将它用卫生纸吸干, 浸入电泳缓冲液中 10 分钟, 重复二次, 即可点样。

电泳缓冲液

0.04mol/L 巴比妥钠, 用 10mol/L NaOH 调至 pH10。将缓冲液倒电泳槽中 (Gelmantank), 若检测 G6PD 在阴极一端加 10 毫克辅酶 (NADP)。

点样

将薄膜置电泳槽桥上, 表面向上, 薄膜要铺平, 然后用点样器将样品点上。

走电泳

电压调至 140V, 电流 10A, 电泳 2—2.5 小时。

(3) 染色——检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD、X 染色体)

0.2mol/L Tris/ml 缓冲液, pH8.025 毫升

glucose-6-phosphate (Na₂salt) 10 毫克

最终浓度为 0.6mmol/L。

0.2mol/L MgCl₂。

NADP (Na₂salt) 5 毫克溶于 1 毫升蒸馏水。

噻唑兰 (MTT) 7.5 毫克溶于 1.5 毫升蒸馏水。

吩嗪二甲硫酸酯 (PMS) 5 毫克溶于 1 毫升蒸馏水。

1% 琼脂

混和 至 , 等量染色液加等量 37 琼脂, 将混和琼脂后的染色液倒入大培养皿, 将薄膜表面向下平铺于染液上, 加盖置 37 , 保温 30 分钟, 取出观察在薄膜上有蓝色带型见图 27-1、D 即已染好, 取出用 4% 冰醋酸清洗后, 保存在 4% 冰醋酸中, 待摄影。

(4) 染色——检测乳酸脱氢酶 (LDH, 11、12 染色体) (见图 27-1, C)

tris (1mol/L) -HCl-EDTA (0.004mol/L)

12.11 克 Tris, 0.149 克 Na₂EDTA, 100 毫升蒸馏水, pH8.6。

乳酸钠 (0.4mol/L)

辅酶 I (NAD) 10 毫克/毫升

NBT (nitrobluetetrazolium) 2.0 毫克/毫升

PMS 0.4 毫克/毫升

1% 琼脂

混和 5 毫升、 5 毫升、 2 毫升、 2 毫升、 2 毫升, 然后加以等量 37 1% 琼脂, 染色同 G6PD。

五、实验结果

细胞融合、选择、检定, 用 Wg3-h 做亲本可以得到含有不同人体染色体的杂种克隆, 用 CHO-K1 做亲本可以得到只留下一条标记的染色体。用前者可以做含有人的不同数目染色体的分布板 (panel), 结合酶的分析进行基因定位。用后者可以进行单条人体染色体上的基因定位, 作 DNA 顺序分析。用细胞融合这个技术还可以进行 PCC (prematuerechromosomecondensation) 的研究, 应用于细胞周期及预测白血病患者的发病率, 以及单克隆抗体等研究。

六、问题

1. 试画一张染色体的分布板，结合酶的分析来进行定位（定 X 染色体上的 G6PD）。

2. 请告诉 G6PD 酶和 LDH 酶的酶谱带型应是怎样的？

参考文献

附录二

（一）溶液配制

1. 1% 酚红：称取酚红 1 克置于研钵内。量取 0.1mol/LNaOH 28 毫升。逐滴加入研钵内尽量磨细，溶解后把 28 毫升 0.1mol/LNaOH 剩余的全部加入。加双蒸水至 100 毫升，4℃ 保存。

2. Hanks 液 10×

甲液：Na₂HPO₄·2H₂O 0.6 克，KH₂PO₄ 0.6 克，KCl 4.0 克，MgSO₄·7H₂O 2.0 克，葡萄糖 10.0 克，NaCl 80.0 克，以上药品溶于 900 毫升双蒸水中。

乙液：CaCl₂·H₂O 1.4 克，单独溶于 100 毫升双蒸水中。

甲、乙二液都溶解后就混在一起，成为母液，用时稀释。取 100 毫升母液，加 900 毫升双蒸水，加 2 毫升 1% 酚红。高压消毒。8 磅 20 分钟。

3. D-Hanks 液 10×（即无 Ca²⁺、Hg²⁺ 的 Hanks 液）。

NaCl 80.0 克，KCl 4.0 克，Na₂HPO₄·12H₂O 0.12 克，KH₂PO₄ 0.6 克，葡萄糖 10.0 克，以上药品溶于 1000 毫升双蒸水中，使用时同 Hanks 液一样。

4. Trypsin-EDTA 液

Trypsin (Difco 1:250) 0.5 克，EDTA 0.2 克，1000 毫升 D-Hanks（含有 2 毫升 1% 酚红）。用 50% 的 NaOH 调至 pH

7.5 过滤灭菌。

（二）透析血清的制备

1. 置透析袋于温水中使其变软。

2. 取灭活小牛血清 200 毫升放入透析袋中，透析袋二头用橡皮筋扎紧，使其勿漏。

3. 放入塑料桶（忌铁器），然后在 4℃ 冰房中，给以流水透析 24 小时，并在水桶中通以空气。

4. 换入 Solu（NaCl 148.0 克，KCl 5.7 克，Na₂HPO₄·7H₂O 5.8 克，KH₂PO₄ 1.66 克，1000 毫升水，用时 1:20 稀释），将水桶置磁力搅拌器上，水桶内放入磁芯，12 小时后更换一次 Solu。

5. 用微孔薄膜过滤，孔由大到小，1.2μ、0.45μ、0.30μ、0.22μ，只有最后一步 0.22μ 的滤膜。滤器需高压消毒过的。

6. 无菌检查，-80℃ 保存。

（邱信芳）

实验二十八植物染色体压片法

一、实验原理

植物根尖的分生细胞的有丝分裂，每天都有分裂高峰时间，此时把根尖固定，经过染色和压片，再置放在显微镜下观察，可以看到大量处于有丝分裂各时期的细胞和染色体。

二、实验目的

根尖染色体压片法，是观察植物染色体最常用的方法，也是研究染色体组型、染色体分带、染色体畸变和姊妹染色单体交换的基础。

三、实验材料

大蒜 (*Allium sativum*)、洋葱 (*Allium cepa*) 的鳞基或蚕豆 (*Vicia faba*) 的种子。

四、实验器具和药品

1. 用具：染色板，载玻片，盖玻片，指管，温度计，试剂瓶，滴瓶，镊子，解剖针，毛边纸。

2. 药品：无水酒精，70%酒精，冰醋酸，对二氯苯或秋水仙素，醋酸钠，碱性品红，石碳酸，甲醛，山梨醇，纤维素酶，果胶酶，中性树胶或油派胶 (Euparal)，二甲苯。

卡诺固定液的配制：用 3 份无水酒精，加入 1 份冰醋酸 (现配现用)。

酶液的配制：以 0.1mol/L 醋酸钠为溶剂，配成纤维素酶 (2%) 和果胶酶 (0.5%) 的混和液。

染色液的配制：配方 . 石碳酸品红 (Carbol. fuchsin)，先配母液 A 和 B。

母液 A：称取 3 克碱性品红，溶解于 100 毫升的 70% 酒精中 (此液可长期保存)。

母液 B：取母液 A 10 毫升，加入 90 毫升的 5% 石碳酸水溶液 (2 周内使用)。

石碳酸品红染色液：取母液 B 45 毫升，加入 6 毫升冰醋酸和 6 毫升 37% 的甲醛。此染色液含有较多的甲醛，在植物原生质体培养过程中，观察核分裂比较适宜，后来在此基础上，加以改良的配方，称改良石碳酸品红，可以普遍应用于植物染色体的压片技术。

配方：改良石碳酸品红

取配方 . 石碳酸品红染色液 2—10 毫升，加入 90—98 毫升 45% 的醋酸和 1.8 克山梨醇 (sorbitol)。此染色液初配好时颜色较浅，放置二周后，染色能力显著增强，在室温下不产生沉淀而较稳定。

五、实验说明

1. 根尖由于取材方便，是观察植物染色体最常用的材料，有些植物种子难以发芽，或仅有植株而无种子，也可以用茎尖作为材料。

2. 植物细胞分裂周期的长短不尽相同，通常在十到几十小时之间，温度明显地影响分裂周期，对于一个不太熟悉的实验材料，最好在特定温度下长根，掌握有丝分裂高峰期，以便得到更多的有丝分裂的细胞。

3. 前处理的目的是降低细胞质的粘度，使染色体缩短分散，防止纺锤体形成，让更多的细胞处于分裂中期，一般在分裂高峰前，把根尖放到药剂中处理 3—4 小时。可处理的药剂很多，如秋水仙素、对二氯苯、8-羟基喹啉等。

4. 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，解离方法有酸解法和酶解法。

(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的观察。根尖分生组织经过酸解和压片后，都呈单细胞，但是大部分分裂细胞的染色体还包在细胞壁中间。

(2) 酶解法常用于染色体显带技术或姊妹染色单体交换等项研究，通过解离和压片，使分生细胞的原生质体，能够从细胞壁里压出，再经过精心的压片，使染色体周围不带有细胞质或仅有少量细胞质，致使多项制片措施直接作用于染色体。

六、实验步骤

(一) 将大蒜或洋葱的鳞基，置于盛水的小烧杯上，放在 25℃ 温箱中，待

根长到 2cm 左右时,在上午九时摘下根尖,放到对二氯苯饱和水溶液,或 0.02%秋水仙素溶液中,浸泡处理 3—4 小时。

(二) 经过前处理的根尖,再放到卡诺固定液中,固定 24 小时。固定材料可以转入 70%酒精中,在 4℃ 冰箱中保存,保存时间最好不超过二个月。

(三) 这里介绍两个解离方法,可以根据实验需要选择使用。

1. 酸解:从固定液中取出大蒜或洋葱根尖,用蒸馏水漂洗,再放到 0.1mol/L HCl 中,在 60℃ 水浴中解离 8—10 分钟,用蒸馏水漂洗后,放在染色板上,加上几滴改良石碳酸品红染色液,根尖着色后即可压片观察。

2. 酶解:取大蒜或洋葱的固定根尖,放在 0.1mol/L 醋酸钠中漂洗,用刀片切除根冠以及延长区(根尖较粗的蚕豆,可以把根尖分生组织切成 2—3 片),把根尖分生组织放到醋酸钠配制的纤维素酶(2%)和果胶酶(0.5%)的混合液中,在 28℃ 温箱中解离 4—5 小时,此时组织已被酶液浸透而呈淡褐色,质地柔软而仍可用镊子夹起,用滴管将酶液吸掉,再滴上 0.1mol/L 醋酸钠,使组织中的酶液渐渐渗出,再换入 45%醋酸。

酶解后的根尖,如作分带或姊妹染色单体交换,可用 45%醋酸压片,如作核型分析或染色体计数等常规压片,可放在改良石碳酸品红中染色,经过酶处理的组织染色速度快。

(四) 压片,把染色后的根尖放在清洁的载玻片上,用解剖针把根冠及延长区部分截去,加上少量染色液,并盖上盖玻片。一个解离良好的材料,只要用镊子尖轻轻的敲打盖玻片,分生组织细胞就可铺展成薄薄的一层,再用毛边纸把多余的染色液吸干,经显微镜检查后,选择理想的分裂细胞,再在这个细胞附近轻轻敲打,使重叠的染色体渐渐分散,就能得到理想的分裂相,要达到这个目的,必需掌握以下几点:

1. 压片材料要少,避免细胞紧贴在一起,致使细胞和染色体没有伸展的余地。

2. 用镊子敲打盖玻片时,用力要均匀,若在压片时稍不留意,使个别染色体丢失,而被迫放弃一个良好的分裂相的细胞。

(五) 封片。把压好的玻片标本,放在干冰或冰箱结冰器里冻结。然后用刀片迅速把盖玻片和载玻片分开,用电吹风把玻片吹干后,滴上油派胶加上盖玻片封片,或经二甲苯透明后,滴中性树脂,加盖玻片封片,做成永久封片。

七、结果

拍摄根尖染色体的分裂相。

参考文献

实验二十九植物染色体组型分析

一、实验原理

各种生物的染色体数目是恒定的。大多数高等动植物是二倍体(diploid)。也就是说,每一个体细胞含有两组同样的染色体,用 $2n$ 表示。其中与性别直接有关的染色体,即性染色体,可以不成对。每一个配子带有一组染色体,叫做单倍体(haploid),用 n 表示。两性配子结合后,具有两组染色体,成为二倍体的体细胞。如蚕豆的体细胞 $2n=12$,它的配子 $n=6$,玉米的体细胞 $2n=20$,配子 $n=10$ 。水稻 $2n=24$, $n=12$ 。有些高等植物还是多倍体。

染色体在复制以后,纵向并列的两个染色单体(chromatids),往往通过

着丝粒 (centromere) 联在一起。着丝粒在染色体上的位置是固定的。由于着丝粒位置的不同, 可以把染色体分成相等或不等的两臂 (arms), 造成中间着丝粒, 亚中间着丝粒、亚端部着丝粒和端部着丝粒等形态不同的染色体。此外, 有的染色体还含有随体或次级缢痕。所有这些染色体的特异性构成一个物种的染色体组型。染色体组型分析是细胞遗传学、现代分类学和进化理论的重要研究手段, 也是一种简便的方法。

二、实验目的

1. 初步掌握植物染色体制片技术、有条件的实验室可以学习染色体显微摄影及放大技术 (参考文献 3)。

2. 分析染色体组型计算有关数据。

三、实验材料

蚕豆、玉米、黑麦或水稻的根尖 (或木本植物的茎尖), 或幼嫩花蕾, 经固定, 染色, 压片 (方法参见实验二十八), 显微摄影, 得染色体照片。也可以由实验室提供染色体制片或放大照片。

四、实验器具和药品

显微镜, 测微尺, 毫米尺, 镊子, 剪刀, 绘图纸。如无现成的染色体照片需备摄影显微镜以及有关摄影器材。

五、实验说明

植物染色体组型分析方法分为两大类, 一类是分析体细胞有丝分裂时期的染色体数目和形态。另一类是分析减数分裂时期的染色体数目和形态, 均能得到染色体组型。

各染色体的长臂与短臂之比称为臂率。

臂率为 1.0—1.7 的归为中间着丝粒染色体, 用 (M) 表示。

1.7—3.0 的归为亚中间着丝粒染色体, 用 (SM) 表示。

3.0—7.0 的归为亚端部着丝粒染色体, 用 (St) 表示。

7.0—更大的归为端部着丝粒染色体, 用 (Ot) 表示。

用 SAT 代表具随体的染色体, 计算染色体长度时, 可以包括随体也可以不包括, 但均要注明。

六、实验步骤

(一) 有丝分裂时期染色体组型分析

萌发的种子的根尖, 或木本植物的茎尖 (特别是倒数第二、第三张嫩叶, 通过固定、染色、压片等可以进行组型分析, 但染色体分散程度差而且形状不固定, 需要制备较多的片子, 才能得到满意的结果。而这些材料通过“去壁低渗法” (见实验二十八) 制备染色体, 可以较快得到优良染色体组型的制片及照片。

1. 测量: 若同染色体制片标本进行直接测量时, 必须利用显微镜与测微尺, 事先要用台微尺对目微尺的单位长度进行标定后再进行工作, 仅对染色体长度较大的标本适合。一般标本还是先行拍照放大, 后进行测量, 可得较好数据。

根据显微测量或放大照片测量、记录染色体形态测量数据如下:

$$(1) \text{ 臂率} = \frac{\text{长臂}(q)}{\text{短臂}(p)}$$

$$(2) \text{ 着丝粒指数} = \frac{\text{短臂}}{\text{该染色体长度}} \times 100$$

(3) 总染色体长度=该细胞单倍体全部染色体长度(包括性染色体)之和

(4) 相对长度 = $\frac{\text{每一个染色体的长度}}{\text{总长度}} \times 100$

(5) 列表(表格于实验结果中)

(6) 配对: 根据测量数据, 即染色体相对长度、臂率、着丝粒指数、次缢痕的有无及位置、随体的形状和大小等进行同源染色体的剪贴配对。

(7) 染色体排列: 染色体对从大到小, 短臂向上、长臂向下, 各染色体的着丝粒排在一条直线上。有特殊标记的染色体(如含有随体的)以及性染色体等可单独排列。

(8) 翻拍或绘图。完成上述步骤的染色体剪贴, 可以通过翻拍摄影或描图成为染色体组型图。

高等植物属异源多倍体种类的较多, 进行组型分析时, 不完全根据染色体大小进行排列, 而事先要根据系统发育的来源进行分组, 然后各组按大小进行编排。例如, 人工培育的小黑麦。来自小麦的染色体组是 AABBDD, 来自于黑麦的染色体组是 RR, 组型分析时不仅应将 RR 分开, 而且小麦本身是个天然的异源多倍体, 又应分成 AA、BB、DD 组几组进行分析。经常见到的植物如棉花、烟草、马铃薯以及许多果树、花卉均具有多倍体品种, 分析时应特别注意。

(二) 减数分裂时期的染色体

在减数分裂过程中, 染色体的形态和行为发生了一系列的变化。特别是减数分裂的粗线期(pachytene), 它是染色体组型分析的良好时期。这时同源染色体已经联会。而每一条染色体包含着 4 条染色单体即成为二价体, 这时, 染色体个体形态明显, 分散度好, 除有稳定的测量长度, 着丝粒位置, 有无随体等特点之外, 某些材料(如玉米)的染色体在一定位置上分布着染色质纽结(knob), 也是染色体特性的标志。

此外, 许多植物在减数分裂时, 在同一个花药中的细胞具有比较好的细胞分裂同步性, 给分析带来了方便。

根据减数分裂粗线期染色体联会的情况。可以了解产生杂种双亲的亲缘关系。在物种起源和新种合成和杂种优势利用中, 有一定的意义。

玉米、百合、鸭跖草的花药, 是利用减数分裂研究染色体组型较好的材料。新鲜固定的蚕豆、豌豆的花蕾也可以利用。本实验选用一种材料进行, 方法同(一)。

七、实验结果

列表并文字、图片说明, 两种组型分析法, 各分析一种植物所得结果。也可用两种方法同时分析一种植物, 比较它们的结果。

参考文献

实验三十植物染色体分带技术

一、实验原理

染色体分带技术已在人类及动物材料的研究中取得了显著的成果, 人类的染色体已有国际标准化带型。70 年代初以来, 人们把分带技术引入到植物染色体研究中来, 形成了各种植物染色体的分带技术。

事实证明, 几乎所有的植物染色体都能显带, 植物染色体显带原理和动物染色体显带原理相似, 是由于特殊的染料和染色体上的某些结构成份发生特

异反应而产生的。因为染料与处理条件的不同可产生不同的带型，因此有 C 带、N 带、G 带等不同的技术，到目前为止，植物染色体分带以 C 带和 N 带技术为主。可以预期，随着分带技术的发展、G 带技术和其它更有效的分带技术一定也会在植物染色体研究中得到应用和发展。

二、实验目的

通过实验，初步掌握植物染色体 C 带分带技术。

三、实验材料

蚕豆种子（当年新种子），大麦种子（当年新种子），小麦种子（当年新种子），洋葱鳞茎（新鲜材料）。

（以上材料任取一种即可）。

四、实验器具和药品

1.用具：冰瓶（内装干冰）或者一只装有 CO₂ 压缩气体的钢瓶，温箱，恒温水浴，分析天平，小台称，量筒，烧杯，染色缸，滴瓶，载玻片，盖玻片，剪刀，镊子，刀片，铅笔，解剖针，橡皮滴头，滤纸，牙签，玻璃板，载片架，切片盒。

2.药品 Giemsa 母液，磷酸缓冲液，2×SSC 溶液，盐酸，甲醇，冰醋酸，氢氧化钡，纤维素酶，果胶酶，胰蛋白酶，秋水仙素。

1. Giemsa 母液

Giemsa 粉剂	0.5 克
甘油（A.R.）	33 毫升
甲醇（A.R.）	33 毫升

将 Giemsa 粉末先加入少量甘油，在玛瑙研钵内研磨至无颗粒为止，再将剩下的甘油全部加入。于 56℃ 温箱内保温 2 小时，再加入甲醇，保存于棕色瓶中，置于冰箱内。

2. 当量盐酸

用酸滴定管量取浓盐酸配成所需当量浓度的盐酸。

	比重 1.19	比重 1.16
0.1mol/LHC	8.25 毫升	9.83 加水至 1000 毫升
0.2mol/LHCl	16.5 毫升	19.66 毫升加水至 1000 毫升
1mol/LHCl	82.5 毫升	98.3 毫升加水至 1000 毫升

3. 2×SSC 溶液（0.3mol/LNaCl+0.03mol/L 柠檬酸钠）

称取 NaCl 17.53 克和柠檬酸钠 8.8233 克置于容量瓶中加水至 1000 毫升。

4. 磷酸缓冲溶液

A 液：配制 0.067mol/L 磷酸二氢钾

称取磷酸二氢钾 9.118 克置于容量瓶加蒸馏水至 1000 毫升。

B 液：配制 0.067mol/L 磷酸氢二钠

称取磷酸氢二钠 9.467 克置于容量瓶加蒸馏水至 1000 毫升。使用时按下列比例混合成缓冲液：

pH 值：	溶液 A (毫升)	+	溶液 B (毫升)
6.7	57.0		43.0
6.8	51.0		49.0
6.9	44.8		55.2
7.0	38.8		61.2
7.1	33.0		67.0
7.2	27.6		72.5
7.3	22.3		77.7

五、实验说明

植物染色体用 Giemsa 染料染色所产生的带型属于 C 带，而不象动物染色体那样产生 G 带，要植物染色体产生 G 带，需要不同的染料和不同的处理方法。本实验着重介绍 Giemsa-C 带法。

1. 关于植物 Giemsa-C 带的说明：所谓植物 C 带主要包括四种带型。

(1) 着丝粒带 (centromeric band)，是指着丝粒及其附近的带，大部分植物均有这种带型。上述的材料中，仅洋葱带型较浅。

(2) 中间带 (intercalary band)，分布于染色体着丝粒至末端之间的带叫做中间带。小麦 B 组染色体中间带较多且明显；蚕豆染色体中间带一般在长臂上。

(3) 末端带 (telomeric band)，位于染色体的末端的带。洋葱有较明显的末端带，小麦仅部分染色体显示，大麦、蚕豆则不显示。

(4) 核仁缢痕带 (nucleolar constriction band)，是指核仁染色体特殊的带型、位于核仁组织中心区，蚕豆、玉米、大麦、小麦均有明显的核仁缢痕带。

由于植物染色体 Giemsa-C 带尚无统一的标准。南开大学遗传教研室在他们编写资料中，提出用带头的字母为代表，记录植物 C 带的显带情况，这是目前较好的 C 带分类方法，现在介绍如下：

完全带类型：处理染色后，同时出现四各带有类型称为完全带，用字母 CITN 表示，黑麦染色体 C 带属于这一类型。

不完全带类型：只显示三种以下的带类型，具体可再分为 4 种。

a. CIN 型：缺乏末端带类型，如大麦、小麦和蚕豆的染色体。

b. CTN 型：不具有中间带类型，如洋葱。

c. TN 型：只有末端带和缢痕带，如玉米等。

d. N 型，只有缢痕带。

除了 C (着丝粒) 带之外，凡双臂染色体的，T、I、N 带均有分布在哪一臂上的问题。如带在短臂上，把“+”号写在字母右上角；如带在长臂上，把“+”号写在字母的右下角。还有，如若干条染色体具有同类带型，则在字母符号前放一系数；而不显带的染色体仅用数字表示 (见图 30-1)。

据此，n 种植物带型表示如下：

蚕豆 $2n=12=2C1+8C1+2CIN$ (见图 30-2)

就是说，有一对同源染色体具着丝粒带和短臂上中间带。4 对同源染色体具着丝粒带和长臂上中间带，和一对同源染色体具着丝粒带，两臂的中间带

和缢痕带。

同理，黑麦 $2n=14=CITN$ 型
 $=2CT+4CI+T+6CI+T+2CI+TN$
玉米 $2n=20=TN$ 型 $=6T++2T++2N++10$

这里的 10 表示 5 对同源染色体不显带。

2. 几种植物染色体 Giemsa-C 带显色法。

由于不同的显带方法能造成不同类型的带型，现将植物染色体分带中，常用的显带法介绍如下：

(1) N 带显带法：

N 带法原指核仁形成区的特殊显带法，但后来发现 $1\text{mol/LNaH}_2\text{PO}_4$ 的热处理，还能显示大麦、小麦的染色体 C 带。具体方法是将空气干燥后的大麦或小麦染色体片子，放在盛有 $1\text{mol/LNaH}_2\text{PO}_4$ 溶液，温度为 93°C 的染色缸中，温浴 5—8 分钟。蒸馏水冲洗后，用 5% Giemsa 溶液 (pH7.2) 染色半小时，经水冲洗后，空气干燥，封片观察。

(2) BSG (Bariumhydroxide, Saline, Giemsa) 法：

经空气干燥的蚕豆或其他植物细胞的染色体制片，用氢氧化钡饱和水溶液处理 5 分钟 (20—25)。后用蒸馏水彻底冲洗， $2 \times \text{SSC}$ ($0.3\text{mol/LNaCl}+0.03\text{mol/LC}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液 65°C 温浴中保温两小时。再经蒸馏水冲洗，稍干后用 5% Giemsa 溶液染色 30 分钟左右，用水冲洗片子上染料，空气干燥后，封片观察。

(3) HSG (HyolorochloricacidSaline, Giemsa) 法：

空气干燥后的洋葱或其它材料的染色体制片，放在 0.2mol/LHCl 中室温处理约 1 小时。蒸馏水冲洗后，置 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中保温 (65°C) 15 分钟，再经蒸馏水冲洗后，稍干用 10% Giemsa 溶液 (pH6.8) 染色 10 分钟左右，水冲洗，空气干燥后，封片观察。

(4) 胰酶 Giemsa (TrypsinGiemsa) 法：

空气干燥后的蚕豆染色体或其它植物染色体制片，置于 0.05% 胰酶溶液中 (pH7.2) 34°C 温浴中保温 15—30 分钟。及时冲洗酶液，10% Giemsa 溶液 (pH7.2) 染色 15—20 分钟，水冲洗后，空气干燥，封片观察。

六、实验步骤

(一) 染色体标本的制备

可以采用酸处理压片法制备染色体或去壁低渗法制备染色体，后者详见实验 (二十八)。本实验介绍压片法制备染色体标本过程如下：

1. 材料培养

材料的培养条件如表 30-1 所示。

2. 前处理

为了得到较多的中期分裂相的染色体，材料需要在分裂高峰期前 2—3 小时用秋水仙素前处理。各种材料都可用剪下根浸入秋水仙碱溶液法进行处理 (见表 30-2)。

表 30 - 2 秋水仙碱的浓度和处理时间

材 料	秋水仙碱浓度	处理时间 (钟点)
蚕 豆	0.05 %	14 点 30 分—17 点 30 分
大 麦	0.05 %	8 点—11 点
小 麦	0.1 %	10 点—14 点
洋 葱	0.2 %	8 点—12 点

3. 固定

甲醇—冰醋酸 (3 : 1) 固定液固定 4—24 小时，以后换入 70% 乙醇中置于冰箱保存。

4. 解离

用酸或酶解离，不仅使根尖组织软化，而且对以后染色体显带效果有关，酸的浓度、温度、处理时间要严格控制。

各种材料，解离的条件很不同，需要不断地摸索，现提供一个参考的条件 (表 30 - 3)。

表 30-3 几种试验材料的解离

试验材料	处 理 方 法
洋 葱	0.1mol/LHCl60 5—8 分钟
蚕 豆	先在 45 % 冰醋酸中浸泡 2—3 小时 (室温) 然后在 55 °C 的 45 % 冰醋酸保温 15 分钟
大麦、小麦	先用 0.5 % 果胶酶-0.5 % 纤维素酶处理 4—5 小时, 然后在 0.1mol/LHCl60 5 分钟

5. 压片、冻片和干片

将根尖放在载片中央，切取尖端不透明部分，滴上几滴 45% 冰醋酸，用镊子从盖片上轻轻敲打，使材料成一片很均匀的薄层。在酒精灯上微热，然后将载片放在硬而平整的桌面上，以左手中指和拇指固定盖片的位置，勿使其移动，再用带橡皮滴头的解剖针后端在盖有毛边纸的盖片上敲打至细胞破裂染色体散开。擦干片子，在显微镜下挑选染色体分散而完整的片子，用干冰或 CO₂ 气体冻片，然后用保安刀片揭开盖片，盖片翻在载片上，在无尘条件下，空气干燥 1—2 周。

(二) 显带处理

可以根据材料和实验需要，采用实验说明中的一种方法进行显带处理。根据我们的经验。蚕豆和洋葱采用 HSG 法较好，而大麦和小麦采用 BSG 法效果较好。

(三) 带型分析

由于植物染色体带型还没有统一的国际化的标准，实验者可以根据自己的工作方法和需要，记录分析的结果，比较不同材料间带型的区别，力求在染色体分带水平上分析染色体类型和生物的遗传结构。一般通过如下步骤进行：

1. 选择染色体数目完整，长度合适，分带清晰的材料进行显微摄影，冲洗

放大后进行染色体剪贴（方法同组型分析）。

2. 详细记录各染色体上，各带纹的位置，宽窄着色深浅和形状等。

3. 绘制染色体模式图，然后在各条染色体模式图上标出各条带纹的位置、宽窄、深浅、形状等线条。

七、实验结果

1. 记录一种植物（以上四种中的一种）带型分析的结果，完成染色体剪贴和带型分析的模式图（如图 30 - 2）。

2. 如果实验未能得到预期的结果，请分析原因。

（沈大稜）

实验三十一植物单倍体的诱发

一、实验原理

植物的无性繁殖和组织培养都说明，植物营养细胞是一个基本功能单位，具有发育成完整植株的潜在全能性。随着组织培养技术的发展，已可把花药放在离体条件下培养，使花粉粒分裂增殖，不经受精而单性发育成单倍体植株。单倍体植株比正常二倍体植株矮小，染色体数为其亲体细胞（ $2n$ ）的一半（ n ）。单倍体经人工加倍或自然加倍，即为纯合的二倍体。育种工作者可以利用这一特性，促使选育材料的性状加速稳定，缩短育种周期，现已成为常规育种的一个辅助手段，也可应用于异花授粉作物自交系的培育。

二、实验目的

1. 了解和掌握单倍体的培养方法及要点。

2. 了解单倍体在育种实践中的意义。

三、实验材料

孕穗后期的水稻（*Oryza sativa*）穗子。

四、实验器具和药品

1. 用具：试管（30 毫米），试管架，量筒，棉塞，吸量管，接种针，酒精灯，培养皿，无菌纸，剪刀，镊子，超净工作台或接种室。

2. 药品：培养基成分（见表 31-1），2, 4-D、萘乙酸（NAA），吲哚乙酸（IAA），6-苄基氨基嘌呤，70%酒精，甲醛，高锰酸钾，漂白粉，铬酸，硝酸，盐酸，氢氧化钠。

3. 培养基配制

（1）大量元素母液：按培养基 5 倍用量称取各种大量元素，用蒸馏水分别溶解，逐个加入（把 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 错开，以免产生沉淀），再定容至 1000 毫升，此液便是培养基 5 倍浓度的母液。

（2）微量元素母液：硼、锰、铜、锌、钴等微量元素，用量极少，可按配方 10 倍的量配成母液。

（3）单独配制铁盐及各有机成分（除蔗糖外）的母液，这类药品用量很少，久放容易变质，可分别配成 0.2—1 毫克/升的母液，并需放在冰箱内保存。

有些药品不易溶解于水，如 2, 4-D、萘乙酸、秋水仙素，可以先溶解于少量的 95% 酒精中，吲哚乙酸可加热溶解，6-苄基氨基嘌呤先溶解于少量 1mol/LHCl，叶酸先溶解于少量 NH_4OH 中，再分别加入蒸馏水，配成一定浓度的母液。

各种母液取出后，加入蒸馏水和蔗糖，花药培养蔗糖浓度较一般组织培养要高些，常用 60 克/升，最后定容至 1000 毫升，加入琼脂后加热溶化，再用

1mol/LHCl 或 NaOH 调节 pH 值，最后分装灭菌。

关于培养基的选择（见表 31-2）。水稻以 Miller 或 N₆ 培养基较合适，花药诱导愈伤组织的培养基称去分化培养基，除上述各种成分外，还需加入 2, 4-D (0.5—2 毫克/升)；促使愈伤组织分化为单倍体植株的分化培养基，则需加入吲哚乙酸 (0.5—2 毫克/升) 或萘乙酸 (0.2—0.5 毫克/升) 和 6-苄基氨基嘌呤 (2 毫克/升)。

五、实验说明

花粉形成单倍体植株有两种方式：

1. 花粉形成愈伤组织，再由愈伤组织分化成单倍体植株，如水稻、麦类等作物。

2. 花粉不经愈伤组织，直接形成胚状体，如烟草、曼陀罗等。

花粉粒形成愈伤组织或胚状体，二者间不存在绝对的界限，主要取决于培养基中生长素的浓度。

杂交育种是选育新品种最常用的方法，由于杂种后代的分离，要得到一个稳定的品系，通常要经过五年以上的选择，应用花药培养，第二年能得到纯合的二倍体。

六、实验步骤

(一) 花粉发育时期的镜检和消毒：严格掌握花粉发育时期，是愈伤组织形成的重要因素。水稻采用单核中、晚期花粉培养比较好，从外形来看，剑叶已伸出叶鞘，和下面一叶的叶枕距为 3—10 厘米（因品种和气候而异），然后镊取花药，加上一滴 15% 铬酸、15% 盐酸和 10% 硝酸的混合液（2 : 1 : 1 体积）压片镜检，可以看到细胞核被染成橙黄色，单核中、晚期的花粉已形成液泡，细胞核被挤到花粉粒边缘。根据镜检花粉粒所在颖壳的颜色和花药在颖壳里的位置为标准，剪去较嫩和较老的小穗把准备接种的小穗放在 10% 的漂白粉的上清液里，消毒 10 分钟，再用无菌水冲洗 2—3 次。

2. 接种和培养：将消毒的水稻小穗，对着光剪去花药上端的颖壳，用镊子将花药剥在无菌纸上，再倒入装有培养基的试管内，放在 28℃ 下进行暗培养，促使花粉粒分裂增殖，形成愈伤组织。

3. 单倍体植株的诱导和染色体加倍：花药培养 20 天左右，在花药裂口处长出淡黄色的愈伤组织，等愈伤组织长到 2—4 毫米时，再转到含有萘乙酸（或吲哚乙酸）和 6-苄基氨基嘌呤的分化培养基上，并用日光灯照明，二周后愈伤组织分化出小植株，当植株长到 2—3 寸时即可移栽，移栽时先将根部的培养基洗去，刚入土的幼苗需用烧杯罩住，防止因水分蒸发而死苗。

水稻花药培养形成的植株大多是单倍体，必需经过染色体加倍后才能结果，一般采用 0.5% 秋水仙素溶液浸泡根和分蘖节。有时经秋水仙素处理后仍是单倍体，虽能形成稻穗和花器管，但不能结实，此时可以把地上部分剪去，让它形成再生稻，以延长生育期来提高加倍频率。在花药培养过程中，也有部分愈伤组织来自药壁或花丝断裂处，它们是由二倍体的亲体细胞分裂而来，因此幼苗分化后，根尖染色体的检查是必不可少的。

七、实验结果

1. 统计花药诱导愈伤组织的频率和愈伤组织分化成单倍体植株的频率，其中绿苗和白化苗各占多少。

2. 拍摄愈伤组织及单倍体植株的照片。

续表

植物	花粉时期	基本培养基	附加成分 (毫克/升)			首先试验成功的国家及年份
			花粉直接成苗	诱导花粉愈伤组织	愈伤组织分化苗	
玉米	单中 - 单晚	Ms 或 N ₆	—	2,4-D(2), 动力精 (0.5-2.0), 蔗糖 10-18%	萘乙酸(0.5-2.0), 动力精 (0.5-2.0), 蔗糖降到 8-12%	中国 (1974)
茄子	单中	Ms(无机盐)+H(有机成分)	萘乙酸(0.005), 动力精(1)	2,4-D(0.25-0.5), 动力精	萘乙酸(0.01-0.1), 动力精(1-2)	中国 (1972)
油菜	单核 - 双核	Miller	—	2,4-D(2), 吲哚乙酸(2), 动力精(1), 酵母汁(1000), 椰乳 15%	基本培养基改为 Ms, 加吲哚乙酸(0.2), 动力精(2)	中国 (1974)
甘蓝	单核 - 接近成熟	Nitsch	—	硫酸素(0.25), 吡哆素(0.25), 烟酸(1.25), 甘氨酸(7.5), 2,4-D(0.5-1.0), 动力精(1.6)	萘乙酸(0.5), 动力精(1)	日本 (1970)
粟	单核	Miller	—	2,4-D(1)吲哚乙酸(1)	吲哚乙酸(2), 动力精(4)	日本 (1971)
杨树	单核	Ms、H 或 Miller 有机成分	—	2,4-D(1-2), 动力精(0-2), 蔗糖浓度 3-6%	吲哚乙酸(0.2-1.0), 动力精或 6 苄基嘌呤(0.5-2.0), 蔗糖浓度 1.5-3%	中国 (1974)

上表摘自中国科学院北京植物研究所, 黑龙江省农业科学院编著“植物单倍体育种”。(陈佩芬)

实验三十二人工诱发多倍体植物

一、实验原理

自然界各种生物的染色体数目是相当恒定的, 这是物种的重要特征。例如玉米体细胞染色体有 20 个, 配成 10 对。遗传学上把一个配子的染色体数, 称为染色体组(或称基因组)用 n 表示。如玉米染色体组内包含 10 个染色体, 它的基数 $n=10$ 。一个染色体组内每个染色体的形态和功能各不相同, 但又互相协调, 共同控制生物的生长和发育、遗传和变异。

由于各种生物的来源不同, 细胞核内可能具有一个或一个以上的染色体组, 凡是细胞核中含有一套完整染色体组的就叫做单倍体, 也用 n 表示。具有两套染色体组的生物体称为二倍体, 以 $2n$ 表示。细胞内多于两套染色体组的生物体称为多倍体。例如三倍体 ($3n$)、四倍体 ($4n$)、六倍体 ($6n$) 等, 这类染色体数的变化是以染色体组为单位的增减, 所以称作整倍体。

在整倍体中, 又可按染色体组的来源, 区分为同源多倍体和异源多倍体。凡增加的染色体组来自同一物种或者是原来的染色体组加倍的结果, 称为同源多倍体。如果增加的染色体组来自不同的物种, 则称为异源多倍体。

多倍体普遍存在于植物界, 目前已知被子植物中有 1/3 或更多的物种是多倍体, 如小麦属 (*Triticum*) 染色体基数是 7, 属二倍体的有一粒小麦, 四倍体的有二粒小麦, 六倍体的有普通小麦。除了自然界存在的多倍体物种

之外，又可采用高温、低温、X 射线照射、嫁接和切断等物理方法人工诱发多倍体植物。在诱发多倍体方法中，以应用化学药剂更为有效。如秋水仙素、萘嵌戊烷、异生长素、富民农等，都可诱发多倍体，其中以秋水仙素效果最好，使用最为广泛。

秋水仙素是由百合科植物秋种番红花——秋水仙 (*Colchicum autumnale*) 的种子及器官中提炼出来的一种生物碱。化学分子式为 $C_{22}H_{25}NO_6 + \frac{1}{2}H_2O$ 。具有麻醉作用，对植物种子、幼芽、花蕾、花粉、嫩枝等可产生诱变作用。它的主要作用是抑制细胞分裂时纺锤体的形成，使染色体不走向两极而被阻止在分裂中期，这样细胞不能继续分裂，从而产生染色体数目加倍的核。若染色体加倍的细胞继续分裂，就形成多倍性的组织，由多倍性组织分化产生的性细胞，所产生的配子是多倍性的，因而也可通过有性繁殖方法把多倍体繁殖下去。

多倍体已成功地应用于植物育种，用人工方法诱导的多倍体，可以得到一般二倍体所没有的优良经济性状，如粒大、穗长、抗病性强等。三倍体西瓜、三倍体甜菜、八倍体小黑麦已在生产上应用。

二、实验目的

1. 了解人工诱发多倍体植物的原理、方法及其在植物育种上的意义。
2. 观察多倍体植物，鉴别植物染色体数目的变化及引起植物其它器官的变异。

三、实验材料

玉米 ($2n=20$)，或大麦 ($2n=18$)、水稻 ($2n=24$) 的种子。

人工诱发的四倍体玉米和二倍体玉米的果穗、玉米粒、花粉、叶片。

四、实验器具和药品

2. 药品：0.1% 和 0.025% 秋水仙素溶液，1mol/L HCl 溶液，改良石碳酸品红溶液（配方见实验二十八），碘化钾溶液。

五、实验说明

本实验采用种子浸渍法。处理种子时，可先在一定浓度秋水仙素中浸种 24 小时左右，在铺有滤纸的器皿上浸渍种子，再注入 0.1%—0.025% 浓度的秋水仙素溶液，为避免蒸发宜加盖并置于暗处，放入 20℃ 培养箱中，保持适宜的发芽温度，干燥种子处理的天数应比浸种多 1 天左右。一般发芽种子处理数小时至三天，或多至十天左右。对于种皮厚发芽慢的种子，应先催芽后再行处理。已发芽的种子宜用较低的浓度处理较短的时间，秋水仙素能阻碍根系的发育，因而最好能在发根以前处理完毕。处理用清水冲洗，移栽于盆钵或田间。

染色体加倍后必须进行鉴别。同源多倍体主要是根据形态特性来判断，如叶色、叶形及气孔和花粉粒的大小。最为可靠的方法，是待收获大粒种子后，再将这些大粒种子萌发，制片根尖压片，然后检查细胞内的染色体数目，只有染色体数目加倍了，才能证明植株已诱变成四倍体。

六、实验步骤

(一) 把玉米 $2n=20$ (或大麦 $2n=18$ 、水稻 $2n=24$) 种子浸在 0.1% 秋水仙素溶液 24 小时。

(二) 用自来水冲洗 2—3 次。

(三) 将萌发种子移到盛有 0.025%秋水仙素溶液润湿了吸水纸的培养皿里。

(四) 置入 20 培养箱，培养发芽。

(五) 48 小时后取出幼苗。

(六) 用自来水缓缓冲洗幼苗。

(七) 把处理后的幼苗栽种在大田或盆钵内。

(八) 同期播种未经处理的玉米种子作为对照。

(九) 田间给以良好管理。

七、实验结果

鉴定多倍体植物

1. 制作四倍体玉米、二倍体玉米根尖细胞压片，检查染色体数目（见实验二十八）。

2. 观察四倍体玉米、二倍体玉米表皮细胞气孔的大小。

(1) 在四倍体玉米叶的背面中部划一切口，用尖头镊子夹住切口部分，撕下一薄层下表皮，放在载玻片的水滴里，铺平，盖上盖玻片，制成表皮装片。

(2) 按上述同样方法制作一张二倍体玉米的表皮装片，作为对照。

(3) 镜检比较四倍体与二倍体气孔和保卫细胞的大小，用测微尺测量记载其大小。

3. 观察比较花粉粒的大小

(1) 从四倍体、二倍体玉米植株上分别采集花粉。

(2) 将采集到的花粉分别浸入 45%冰醋酸。

(3) 用滴管分别各取一滴花粉粒悬浮液，移到载玻片上。

(4) 滴上碘化钾溶液，盖上盖玻片，制成花粉粒制片。

(5) 镜检四倍体及二倍体玉米花粉粒大小。

(6) 用测微尺测定并记载其大小。

4. 作业

(1) 描绘四倍体玉米中期染色体图像。

(2) 将镜检观察结果列成一表，并分析记载结果。

实验三十三植物有性杂交技术

一、实验原理

植物有性杂交是人工创造植物新的变异类型最常用的有效方法，也是现代植物育种上卓有成效的育种方法之一。通过将雌雄性细胞结合的有性杂交方式，重新组合基因，借以产生亲本各种性状的新组合，从中选择出最需要的基因型，进而创造出对人类有利的新种。根据进行杂交亲本间亲缘关系的远近（表 33-1，2，3），有性杂交又区分为近缘杂交及远缘杂交两大类，前者是指同一植物种内的不同品种之间杂交，后者指在不同植物种或属、科间进行的杂交，也包括栽培种与野生种之间的杂交。秈稻与粳稻属不同亚种，秈、粳稻杂交，亦属远缘杂交。品种间杂交为近缘杂交，由于品种间亲缘关系较近，具有基本相同的遗传物质基础，因此品种间杂交易获成功。通过正确选择亲本，能在较短期间选育出具有双亲优良性状的新品种，但在品种间杂交时，因有利经济性状的遗传潜力具有一定限度，往往存在有品种之间在某些性状上不能相互弥补的缺点。而采用远缘杂交的方式，可以扩大栽培植物的种质库，能把许多有益基因或基因片段组合到新种中，以使产生新的有益性状，从而丰富了各类植物的基因型。通过远缘杂交又可获得雄性不育系，扩大杂种优势的利用。但远缘杂交的最大缺点，表现在远缘杂交交配往往不易成功，杂种夭亡，而且结实率很低，甚至完全不育；杂种后代出现强烈的分离，中间类型表现不稳定，因而增加了远缘杂交的复杂性和困难，限制了远缘杂交在育种实践上的应用。

二、实验目的

1. 理解小麦或水稻有性杂交的原理。
2. 了解小麦或水稻的花器构造，开花习性，授粉、受精等有性杂交基础知识。
3. 掌握小麦或水稻有性杂交技术。

三、实验材料

普通小麦品种 3—4 个或水稻品种 3—4 个。

四、实验器具和药品

1. 用具：镊子，眼科手术剪刀，玻璃透明纸袋，回形针，大头针，铅笔，小纸牌（白色，大小为 3×4 厘米），放大镜，棉花球，六磅热水瓶，500 毫升烧杯。

2. 药品：95% 酒精。

五、实验说明

1. 小麦杂交技术

（1）小麦的花器构造（图 33-1）：小麦为禾本科（Gramineae），小麦属（Triticum）的自花授粉作物，复穗状花序，穗轴由许多短节片组成，节上着生小穗。小穗基部着生两个护颖和 3 至 9 朵小花，第一、二朵花发育较好，小麦上部的花有些往往不结实。每朵小花有内、外颖各 1 个，雄蕊 3 个，雌蕊 1 个。在子房下方靠外颖的一侧，有两个鳞片。开花时吸水膨胀，呈圆球水滴状，使内外颖张开。雄蕊由花丝、花药两部分组成，花药两裂。花粉粒光滑呈球形，扁圆形或卵圆形。花粉粒直径大小，因各类小麦而有差别。普通小麦花粉粒直径为 61—65 微米，一粒小麦 37—45 微米，二粒小麦 48 微米。花粉粒由二层细胞膜组成，外层为角质层体，内层为纤维质体，中间具有原

生质体及二个细胞核。

2. 小麦杂交实验步骤

(1) 选穗及整穗：在母本植株中，选择典型，健壮无病并刚抽出叶鞘未开花的麦穗。将基部和上部发育不良的 2—3 个小穗除去。每侧各留 5—7 个小穗，然后再把留下小穗上部发育不良的小花除去。

留基部两侧 1—2 朵发育良好的小花。有芒品种则把芒剪去，以免妨碍去雄授粉工作。

(2) 去雄：去雄工作从穗的一侧上部小穗开始顺序而下。一侧去雄完毕，再进行另一侧去雄工作。

以免上部小穗的花药落在下部已去雄的小穗中。同时防止遗漏。常用的去雄方法有下述二种：
裂颖法：去雄时，用左手中指和拇指夹住麦穗再用食指从小花颖壳的顶端处轻轻压下，使内外颖处稍有缝隙。然后用镊子小心地除去三枚雄蕊的花药，注意不要把花药夹破及伤害柱头。如有花药破裂，则应除去该小花，并用酒精杀死附在镊子上的花药。去雄后立即套上隔离纸袋，悬以小纸牌。注明母本品种名称，去雄日期，去雄花数，作者等。裂颖法工作较为简便，能够获得较多杂交种子。

剪颖法：用剪刀剪去小花上部三分之一左右的颖壳，然后用镊子从剪口处小心取出花药，套上隔离纸袋（挂牌及书写内容同裂颖法）。这种方法操作方便，但剪去 1/3 颖壳，杂交种子的饱满度较差。

(3) 授粉：去雄后 1—3 天内即可授粉，授粉时间以上午九时左右较为适宜，下午 4 时以前亦可进行授粉。授粉前检查母本去雄穗的小花柱头，一般未成熟柱头不分叉，衰老的柱头萎蔫无光，授粉适期柱头呈羽毛状分叉，而且有闪闪发亮的特征。小麦花粉生活力的长短与温湿度关系甚大。在 42℃ 高温条件下经 30 秒钟，花粉即丧失发芽力。在 10℃ 以下温度及 50% 以上湿度条件下保藏花粉，虽能保持正常发芽力，但其结实率不如直接授粉法为高。以下列举几种常用的授粉方法。

花药授粉法：授粉时先选取穗中部已有花药露出颖外的父本植株，用镊子取下花粉成熟的黄色花药，放入去雄穗的小花柱头上。轻轻涂抹授粉，在每朵小花中放入一枚花药。授粉结束后套上纸袋，并在纸牌上标名父本名称、授粉日期。

花粉授粉法：选取正在开花的父本植株，在穗子上套一玻璃纸袋，弯下穗子并轻轻拍打采集花粉。然后用毛笔蘸取花粉，按小花顺序依次进行授粉。套袋挂牌等操作同上。

捻穗授粉法：这一方法适用于剪颖去雄法的穗子，用长约 15 厘米，两头均不封口的玻璃纸袋套住全穗。纸袋下端斜，上端平，分别用大头针别住。授粉时把正在开花的父本穗倒插入纸袋。在母本穗子上凌空捻转数次。让父本花粉撒落在小花柱头上。然后再用大头针封住纸袋上口。悬以纸牌，并标明父本名称，授粉日期。

本实验任选二种授粉方法进行比较结实率的高低。

(4) 实验结果的检验：

小麦杂交后受精迅速，在授粉后 4—5 天即可检查，凡柱头枯萎，子房膨大者，说明已结实。25—30 天后收获杂交种，脱粒，保存。按下表填写实验结果。并对结果进行分析比较。

授粉方式	杂交组合	去雄花数	授粉花数	结实数	结实率%
捻穗授粉法					
花药授粉法					

2. 水稻杂交技术

(1) 水稻的花器构造：栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 属禾本科，稻属植物。稻穗为圆锥花序，其上着生小穗。穗轴有 2 个节，由节着生枝梗。从枝梗再生出小枝梗，其先端着生小穗。一个小穗为一颖花，由内颖、外颖、护颖、副护颖、鳞片、雌蕊、雄蕊各部分组成 (图 33-2)。

内外颖：内外颖呈尖底船状，位于两护颖之间，外颖有芒或无芒，内颖一般无芒。

护颖与副护颖：护颖着生于内外颖的外侧，长度一般约为内外颖的三分之一左右。副护颖着生在小穗轴的顶部。呈膨大的环状体。两边明显倾斜，形成极小的鳞片状。

鳞片：位于外颖内侧，为扁平无色的肉质薄片，共有二枚。

雄蕊：雄蕊 6 个，每 3 个一排，着生于子房基部。花丝细长。花药分为四室、花粉粒表面较光滑呈球形。

雌蕊：分柱头、花柱和子房三部分。位于颖花的中央。柱头羽状分叉，子房卵形。内有一个胚珠，为内外珠所包着。胚珠上方有珠孔，珠被内由薄壁细胞组成的珠心，是胚珠的重要部份。珠心内有一个发育着的生殖细胞的胚囊。

(2) 实验步骤：

选择单株：选择生长健壮、无病害，并对原品种或品系有代表性植株 2—4 株。

选择单穗：从所选单株中选出已抽出 1/3—2/3 的单穗，将所选定去雄之穗，剥去叶鞘，以防折断茎秆。

剪去上部和基部颖花：用剪刀将穗顶部已开过花的颖花剪去。同时剪去穗部过嫩的颖花 (花药高度不到颖花的一半)。

去雄：去雄方法有下列二种：

a. 温汤去雄法：水稻花粉与雌蕊耐温性不同，根据这一原理，选择一定温度的温水处理颖花，就可达到既可杀死花粉而不影响雌蕊生活力的目的。一般秈稻采用 43℃ 温水浸穗 5—10 分钟，粳稻则采用 45℃ 温水浸穗 5 分钟效果较好。具体方法是把热水瓶的温水调节好，选好稻穗，把稻穗轻轻压弯，穗子全部浸入温水之中。5 分钟后移去热水瓶，取出稻穗。剪去未开花颖花。留下开花颖花。

b. 剪颖摘除花药法：用剪刀斜剪去颖壳 1/3—1/4 (防止剪得过低伤及柱头，过高则不易摘除花药，对授粉也不利)。用镊子取出六个雄蕊，但不能损伤雌蕊。

去雄后套袋，悬以纸牌标名母本名称、去雄日期、作者姓名等。

授粉：

a. 检查母本植株穗：整穗去雄是否彻底，有否漏剪的颖花。

b. 父本穗的采集：开花前安排足够时间采集父本穗，选取正在开花的单穗 (穗顶部的一些颖花已能看到花药)。在穗部以上适当长度处剪断，插在盛水烧杯内备用。

c. 捻穗授粉法：参阅小麦杂交技术实验步骤中授粉一节。

d. 花药授粉法：参阅小麦杂交技术实验步骤中授粉一节。

套袋挂牌：将玻璃纸袋套在稻穗上，留将纸袋基部边缘折叠，用回形针把折叠处夹住使之固定，将杂交纸牌系在已授粉母本植株的茎秆上。

(3) 实验结果的检验：每人用上述二种去雄方法各做 2—4 穗，授粉后 3—4 天检查子房是否膨大，杂交后 25 - 30 天，杂交种子即已成熟，剪下稻穗用手工脱粒，晒干保存，按下表统计收获种子数，并比较两种去雄方法的杂交效果。

</PGN0252.TXT/PGN>

实验三十四植物细胞的脱分化和分化培养

一、实验原理

分化了的植物根、茎、叶细胞往往具有全能性，在一定条件下进行离体培养，给予一定的营养与激素，可以脱分化为愈伤组织，由愈伤组织制备成细胞悬浮液，在一定的条件下经振荡培养，逐渐形成具有两极性的胚状体，经过进一步的分化培养，给予不同的营养和激素成分，又可以生出完整的小植株。植物的脱分化和分化培养，证明分化了的植物细胞仍具备形成完整植株所需要的全套基因。在一定条件下，活动的基因可以关闭、已关闭的基因又可以重新启动、再行由胚到成熟植株发育过程中有关基因的先后活动程序。

二、实验目的

- 1.通过实验，掌握无菌操作方法，将胡萝卜贮藏根培养成为愈伤组织。
- 2.用无菌操作方法，把烟草组织或甘蓝花茎直接培养成分化小植株。

三、实验材料

胡萝卜贮藏根每组二根，甘蓝花茎或烟草茎每组二根。

四、实验器具和药品

每组铝饭盒 3 个，大培养皿 2 套，250 毫升烧杯 2 只，漂白粉过滤液 200 毫升，70%酒精，酒精棉花，镊子 2 把，保安刀 2 把，小镊 1 把，无菌水。

脱分化培养基各组 6 瓶，30 毫升/瓶

分化培养基各组 4 瓶，30 毫升/瓶

MS 培养基：每升中含

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.44 克
KNO ₃	1.9 克
NH ₄ NO ₃	1.65 克
KH ₂ PO ₄	0.15 克
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.37 克
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3 毫克
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	11.5 毫克
H ₂ BO ₃	6.2 毫克
KI	0.83 毫克
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 毫克
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 毫克
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 毫克
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 毫克
Na ₂ EDTA	37.3 毫克
Nicotinic acid (烟酸)	0.5 毫克
ThiamineHCl (B ₁)	0.1 毫克
PyridoxineHCl (B ₆)	0.1 毫克
甘氨酸	3.0 毫克
肌-肌醇	100.0 毫克
蔗糖	20.0 克

固体培养基：MS 液体加 0.8%琼脂

脱分化培养：MS 培养基加 2, 4 - D2 毫克/升

BA0.2 毫克/升

分化培养基：1. MS 培养基加 KT (或 BA) 2 毫克/升

2. MS 培养基加 KT (或 BA) 2 毫克/升+IAA0.05 毫克/升

其中 KT 为激动素、BA 为 6-苄基嘌呤、IAA 为吲哚乙酸 (2 种分化培养基, 采用一种即可)

五、实验说明

脱分化培养基和分化培养基的主要区别在于激素的成分和含量上, 说明各种激素的出现和含量改变对于植物组织分化起着重要的作用。许多植物从脱分化到分化过程对培养基里激素成份要求严格、有的还要进行液体培养才能重新分化。例如, 胡萝卜贮藏根组织, 是最早用于研究植物细胞的全能性的材料, 至今仍是研究脱分化的好材料, 但当胡萝卜组织形成愈伤组织之后, 若要它们重新分化, 必须经过振荡培养和采用合适的培养基, 条件较为复杂。另一些植物, 例如烟草的根、茎、叶和甘蓝的花茎等容易进行脱分化和分化培养, 不需液体振荡培养可以在固体培养基上直接完成, 是两类较好的实验材料。

六、实验步骤

(一) 操作前用温水和肥皂将手充分擦洗干净, 尽量做到不带菌。

(二) 将事先用自来水洗净的烟草茎, 甘蓝花茎或胡萝卜贮藏根切成一定的大小 (一般茎、根约为 2 厘米长、宽)。

(三) 完成以上步骤后, 又应用 70% 酒精棉花擦手, 以便再行消毒。

(四) 用消毒镊子将根或茎的切段投放到装有 70% 酒精的大培养皿中浸泡 30 秒钟。

(五) 切段自酒精中取出后, 立即浸泡于装有 15% 漂白粉精片水溶液的大培养皿中达 20 秒钟。

(六) 以上组织切段经分别装有无菌水、的铝饭盒各 10 分钟, 进行漂洗, 最后置于无菌水中达 20 分钟以上。

(七) 切段自无菌水中取出后, 立即放于 9 厘米灭菌培养皿中, 盖上皿盖, 放于灭菌接种箱。

(八) 在灭菌箱中, 无菌操作, 削去植物茎、根的外部, 叶子的边缘。

(九) 把正常部分切成 3mm × 3mm × 1.5mm 大小方块, 叶组织切成 1.5cm × 1.5cm 方块。

(十) 由小镊子和接种针, 在无菌条件下, 将组织小块放入盛有脱分化培养基的三角烧瓶中, 每瓶放 5—6 茎, 根组织块或 3—4 块叶片组织块。挂上标签, 写明日期, 组号。

(十一) 20—25 避光培养 3—4 星期后观察。

(十二) 烟草或甘蓝的花茎、长成的愈伤组织, 可用同样的无菌操作法, 再接种到分化培养基上, 3—4 星期再进行观察。

胡萝卜材料要经过液体培养基振荡培养, 才能分化 (本实验从略)。

七、实验结果

(一) 观察并记录接种的脱分化培养的组织细胞有无污染?

(二) 愈伤组织细胞是否出现绿色? 讨论其来源与影响?

(三) 烟草组织或甘蓝花茎经过分化培养、长出完整的植株, 说明什么问题? 在理论和实践中有何价值?

实验三十五诱变物质的微核测试

一、实验原理

微核 (micronuclei) 简称 (MCN) 是真核类生物细胞中的一种异常结构, 往往是细胞经辐射或化学药物的作用而产生的。在细胞间期, 微核呈圆形或椭圆形, 游离于主核之外、大小应在主核 1/3 以下。微核的折光率及细胞化学反应性质和主核一样, 也具合成 DNA 的能力。一般认为微核是由有丝分裂后期丧失着丝粒的断片产生的。我们科研工作证实, 整条的染色体或好几条也能形成微核。这些断片或染色体在细胞分裂末期被两个子细胞核所排斥便形成了第三个核块。已经证实微核率的大小是和用药的剂量或辐射累积效应呈正相关, 这一点和染色体畸变的情况一样。所以许多人认为可用简易的间期微核计数来代替繁杂的中期畸变染色体计数。由于大量新的化合物的合成, 原子能应用, 各种各样工业废物的排出, 使人们很需要有一套高度灵敏, 技术简单的测试系统来监视环境的变化。只有真核类的测试系统更能直接推测诱变物质对人类或其它高等生物的遗传危害, 在这方面, 微核测试是一种比较理想的方法。目前国内外不少部门已把“微核测试用于辐射损伤、辐射防护、化学诱变剂、新药试验、染色体遗传疾病及癌症前期诊断等各方面。

现有的微核测试系统多数是用哺乳动物的骨髓细胞或外周血细胞。缺点是需要一定培养条件与时间、细胞同步化困难、微核率低, 一般只在 0.2% 左右。近年来, 有人采用高等植物花粉孢子利用它们天然的同步性作微核测试材料, 取得良好的效果。其中马德修用一种原产于美洲的鸭跖草 (*Tradescantia paludosa*) (一种叶子狭长形的鸭跖草, 目前我国许多地方已经引种), 建立四分孢子期微核率计数 (MCN-in-Tetrad) 的测试系统, 是近年来报导的较好系统之一。该系统用低剂量的化学药物处理或辐射处理, 其微核率可达 10%—67%。

二、实验目的

1. 是了解微核测定的方法与意义。
2. 为寻找新的测试系统或测定更多的环境因素。

三、实验材料

具有幼嫩花序的鸭跖草 (长在温室中的鸭跖草都能现蕾开花, 大田栽培花期也很长), 剪取花序, 每种处理重复 3 根。

四、实验器具和药品

1. 培养液: Knop 氏培养液: 1000ml 蒸馏水+磷酸二氢钾 0.25g+硫酸镁 0.25g+硝酸钙 1.00g+硝酸钾 0.25g+微量磷酸铁。

2. 处理液: EMS (甲基磺酸乙酯), 由培养液配成, 50mmol/L, 75mmol/L, 100mmol/L, 150mmol/L 等各种处理浓度。NaN₃ (叠氮钠), 由培养液配成, 0.2mmol/L, 0.4mmol/L, 0.8mmol/L 等各种浓度。

DES (硫酸二乙酯) 由培养液配成 50mmol/L, 100mmol/L, 150mmol/L 等各种浓度。

3. 固定液: 3 甲醇: 1 冰醋酸

染色: 改良碱性品红液 (配法参看实验二十八)

实验用具: 30ml 三角烧瓶, 剪刀, 镊子, 载玻片, 盖玻片等。

五、实验说明

处在分裂过程中的细胞, 对理化因素的处理是有一定敏感时期的。鸭跖草的花粉母细胞在减数分裂前期对药物作用较为敏感, 所以要取幼嫩的花序进

行试验。各个花序中间老、两边嫩，一般能找到具适合时期的花芽。前期造成的染色体损伤应经过 24—30 小时的培养，在四分体中以微核形式出现。处理过程中所产的落后染色体或落后染色体组也能在四分体中以较大形式的微核出现。大、小微核形成机制有所不同，此处均作染色体变化指标。

六、实验步骤

(一) 各三角烧瓶中加入各种浓度的处理药物和 Knop 培养液。各种处理重复 3 瓶、并留 3 瓶 Knop 液作对照。

Knop 液含 0.2mmol/LNa ₃ (叠氮钠)	3 瓶
Knop 液含 0.4mmol/LNa ₃	3 瓶
Knop 液含 0.8mmol/LNa ₃	3 瓶
Knop 液含 50mmol/LEMS (甲基磺酸乙酯)	3 瓶
Knop 液含 100mmol/LEMS	3 瓶
Knop 液含 150mmol/LEMS	3 瓶
Knop 液含 50mmol/LDES (硫酸二乙酯)	3 瓶
Knop 液含 100mmol/LDES	3 瓶
Knop 液含 150mmol/LDES	3 瓶
对照 Knop 液	3 瓶

(二) 剪取新鲜的鸭跖草花序，每瓶插入 3 根，24 中光照培养 30 小时。

(三) 培养的花序分瓶固定在 3 甲醇：1 冰醋酸固定液中，48 小时后转移到 70% 酒精中，可长期冰箱保存。

(四) 取适当大小，处于四分孢子早期的材料，改良碱性品红染色压片观察 (见实验二十八)。

七、实验结果

微核数/四分孢子数，填表并作曲线图。测定微核结果：

A. 甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理 MCN/Tetrad100

重复	对照	50 m molL	100m m oL	200 m molL
1				
2				
3				
平均				

B. 叠氮钠 (Na₃) 处理 MCN/Tetrad100

重复	对照	0.2 m molL	0.4 m molL	0.8 m molL
1				
2				
3				
平均				

C. 硫酸二乙酯 (DES) 处理 MCN/Tetrad

重复				
1				
2				
3				
平均				

D. 其它处理

实验三十六植物同工酶技术

一、实验原理

同工酶 (isozymes) 是指作用于底物相似或完全相同的酶的不同分子形式, 即催化同一种反应而结构不同的一族酶。它们是受遗传体系决定的酶的不同分子形式。利用凝胶电泳技术可以将它们分开, 用专一的作用底物和特殊染料, 把需要分析的酶染色, 在胶柱上呈现同工酶谱。

二、实验目的

1. 通过实验掌握植物同工酶实验技术, 了解植物同工酶分析在遗传学研究中的意义。

2. 着重掌握过氧化物酶的提取, 电泳与染色技术和分析方法。

三、实验材料

以下内容任选一组或二组即可

1. 二种不同品种蚕豆。
2. 蚕豆的新种子和储藏 2—3 年陈种子。
3. 蚕豆与豌豆。
4. 甘蓝和甘蓝型油菜的幼苗嫩叶。
5. 不同品种的柑桔嫩叶。

四、实验器具和药品

1. 用具: 电泳仪, 电泳槽, 注射筒及针头, 微量注射器, 装凝胶用玻璃管 (内径为 5 毫米、长度为 90 毫米)、离心机。

2. 药品: 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 四甲基乙二胺 (TEMED), 丙烯酰胺 (Acr), 甲叉双丙烯酰胺 (Bir), 甘氨酸, 过硫酸铵, 蔗糖, 溴酚蓝, 联苯胺, 过氧化氢。

五、实验说明

同工酶的不同分子形式, 可以出现在同一生物的不同发育时期, 所以取不同期的材料, 酶带的情况就不一样。这是同工酶技术适用于发育研究的方便之处。另一方面, 利用同工酶技术进行遗传学分析与群体遗传学研究时, 则特别要求取材的一致性。否则, 它们之间的差异可能不是遗传而是由发育造成的。例如要比较两个品种蚕豆的遗传差别, 可用它们的发芽种子进行比较。但这时至少应该检查是否是同年的种子、是否在发芽前都晒过种、是否是同时浸种, 是合是恒温发芽, 以及是否是取同样部位和同样分量等。

六、实验步骤

(一) 不同品种或种间的植物, 取发育时期相同, 组织相同的样品, 制备酶粗提液。一般取样 0.5 克, 或在恒温条件下发芽的幼苗 3—5 个, 置于研钵中, 加入 0.1 毫升—0.5 毫升水研磨匀浆、后将样品移至小离心管中离心 (3500rpm) 15 分钟, 取上清液, 混入等体积的 50% 的蔗糖溶液, 电泳前可在冰箱中保存。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶系统的配制

A 液: 1mol/LHCl 48.0 毫升, Tris 36.4 克: TEMED 0.23 毫升加水至 100 毫升, pH 8.3。

B 液: 丙烯酰胺 28.0 克; 甲叉双丙烯酰胺 0.735 克加水至 100 毫升。

C 液: 过硫酸铵 (用前配制) 1.4%。

配胶: A B C H₂O = 1 2 0.4 4.6

配胶后立即灌好装胶的玻璃管

(三) 电极缓冲液配制

Tris 30.0 克

甘氨酸 14.4 克

加水至 1000 毫升、pH 8.3、使用时稀释 10 倍。

(四) 染色液配制——过氧化物酶染液

醋酸联苯胺溶液 5 毫升，3% H₂O₂ 2 毫升，H₂O 93 毫升

(五) 加样和电泳

各根凝胶管加入 0.05 毫升的样品酶粗提液 0.05 毫升。加一小微滴 0.005 % 溴酚蓝，上下电泳槽加电极缓冲液后在低于 15 °C 气温中，每管电流 2mA 进行电泳，当溴酚蓝迁至凝胶下端 0.5—1 厘米时停上电泳。电泳时间 3—4 小时。

(六) 用长针头注射器注水法自凝胶管中取出凝胶，凝胶要完整，不能断裂。

(七) 染色：将完整的凝胶条置于中号试管中，加入染色液，浸泡整条凝胶，室温下染色 20—30 分钟，呈现酶带后取出凝胶，用水漂洗终止染色。

(八) 带型清楚的胶应作摄影记录或作扫描测定，胶凉干后还作永久保存 (图 36 - 1)。

七、实验结果

1. 记录实验的操作程序，检查是否和原设计相符合？

2. 将各胶柱中酶带条数、宽度、着色深浅和移动距离填入表中。

胶柱样品	可见酶带数	由近及远记录酶带迁移距离	宽度	着色深浅	相对迁移率 (主要酶带)	是否有特殊酶带
1						
2						
3						

3. 选择比较组分胶柱中、着色最深的酶带或特殊酶带 (即该组分特有酶带)，计算酶带的相对迁移率 R_f 值

$$R_f = \frac{\text{某酶带迁移距离}}{\text{溴酚蓝指示剂迁移距离}}$$

</PGN0271.TXT/PGN>

