

# 遗传育种学实验教案

2008—2009 学年度第 一 学期

开课单位水产学院

课程名称遗传育种学实验

授课班级养殖 0711-0713

任课教师马英 蔡明夷

# 实验一 鱼类肾细胞的染色体制作技术

## 一、教学目的：

1. 掌握鱼类肾细胞染色体制作的原理和技术

## 二、教学重点：

1. 掌握鱼类肾细胞染色体制作的原理和技术

## 三、教学难点：

鱼类肾细胞染色体制作的原理和技术

## 四、教学方法：

- 1、实验演示与指导
- 2、学生操作

## 五、教学用具：

**实验材料：** 鲫鱼（或罗非鱼，或鬼鲶）成鱼。

**实验器材：** 甲醇、冰醋酸、注射器、针头、剪刀、镊子、尼龙筛绢（260 目）、离心机、离心管、吸管、显微镜。

**实验试剂：** PHA 溶液、鱼类生理盐水、秋水仙素溶液、0.075M 的氯化钾低渗溶液、卡诺氏固定液和 Giemsa 染色液

## 六、教学过程：

1. 讲解实验目的，实验原理，实验材料、器材与试剂，实验步骤以及实验操作中的注意事项。

2. 演示注射、解剖、剥取头肾和细胞悬液制备等步骤。

3. 安排学生按照讲义进行实验。

4. 在固定过程中，安排同学观察染色体示范片。

5. 完成固定步骤进行滴片和染色演示，同时说明影响结果的因素与注意事项。

6. 组织学生观察染色体制片，根据同学制片的效果和上课实验操作表现给出现场操作成绩。

## 七、课程小结：

注意培养同学动手能力、观察能力、结果分析能力。

## 八、作业：

撰写实验报告。

## 实验二 染色体核型分析方法

### 一、教学目的：

1. 掌握染色体组型分析的方法

### 二、教学重点：

1. 掌握染色体组型分析的方法

### 三、教学难点：

掌握染色体组型分析的方法

### 四、教学方法：

- 1、实验演示与指导
- 2、学生操作

### 五、教学用具：

**实验材料：**杂色鲍染色体图

**实验器材：**圆规、直尺或三角板、剪刀。

### 六、教学过程：

1. 讲解实验目的，实验原理，实验材料、器材与试剂，实验步骤以及实验操作中的注意事项。
2. 安排学生按照讲义进行实验。

### 七、课程小结：

注意培养同学动手能力、观察能力、结果分析能力。

### 八、作业：

撰写实验报告。

### 实验三：鱼类肝脏酯酶同工酶电泳分析

教学方法：教师先用约 30 分钟的时间讲述实验的目的、原理、实验材料、器材、试剂、实验步骤、注意事项以及实验报告的要求等，重点或难点之处需要给学生做演示。然后学生自己动手实验，教师实时指导。

教学学时：8 学时

一、目的：了解原理、掌握技术、加深对同功酶概念的认识和了解

二、原理：

什么是同功酶？

同工酶 → 聚丙烯酰胺凝胶电泳 → 不同酶蛋白带被分开 → 染色显出谱带  
丙烯酰胺 (Acr) + 甲叉双丙烯酰胺 (Bis, 交联剂) → (APS, TEMED) 聚  
丙烯酰胺

醋酸萘酯 (酯酶水解) → 水解产物 (+ 坚牢蓝) → 显色

三、材料：鲫鱼 (肝脏)

四、器材：注意移液枪的量程和用法、离心机的用法

五、实验试剂：边讲述便请同学自己检查台面上的试验试剂

六、步骤：

安装电泳槽 (教师演示) → 制胶 → 样品制备 → 上样前的准备 → 上样 →  
电泳 (黑板图示) → 剥胶 (演示) → 染色 → 保存 → 观察记录 (黑板图  
示) → 收拾台面

七、注意事项：样品尽量保持低温；离心要平衡；丙烯酰胺有毒；灌胶动作要迅速以防聚合；

八、作业：完成实验报告，画图说明试验结果。

迁移常数： $R = \text{酶带中心与原点的距离} / \text{溴酚兰与原点的距离}$

两种生物的相同值 =  $\text{两种生物相同酶带数} / (\text{不同酶带数} + \text{相同酶带数})$

## 试验四：鱼类 DNA 简易提取法

教学方法：教师先用约 30 分钟的时间讲述实验的目的、原理、实验材料、器材、试剂、实验步骤、注意事项以及实验报告的要求等，重点或难点之处需要给学生做演示。然后学生自己动手实验，教师实时指导。

教学学时：4 学时

一、目的：了解原理、掌握提取方法

二、原理：

缓冲液裂解细胞 → 蛋白酶 K 消化去蛋白 → 酚、氯仿抽提去蛋白 → 离心分层 → 乙醇沉淀 DNA → TE 溶解 DNA

三、材料：大黄鱼（肝脏）

四、器材：

五、试剂：

六、步骤：

研磨样品（匀浆） → 酚/氯仿抽提蛋白（750ul） → 离心分层 → 重复抽提 → 氯仿/异戊醇抽提 → 离心 → 上清用 95%乙醇沉淀 → 75%乙醇洗涤 → TE 或 ddH<sub>2</sub>O 溶解（50—200ul） → 收拾台面

七、注意事项：

样品要磨成匀浆；动作要轻柔；离心时要平衡；DNA 干燥要适当

八、完成试验报告，描述 DNA 提取过程中观察到的现象

## 实验五 DNA 浓度测定与纯度鉴定

教学方法：教师先用约 30 分钟的时间讲述实验的目的、原理、实验材料、器材、试剂、实验步骤、注意事项以及实验报告的要求等，重点或难点之处需要给学生做演示。然后学生自己动手实验，教师实时指导。

教学学时：2 学时

一、目的：了解原理、掌握 DNA 浓度测定和纯度鉴定的方法

二、原理：

1. 二苯胺显色法：

2. 紫外光谱分析法：

浓度：DNA 和 RNA 在 260 nm 和 280 nm（蛋白质）处有吸收峰，吸收强度与 DNA 或 RNA 浓度成正比。1 OD<sub>260</sub> ≈ 50 μg/ml 双链 DNA。

纯度：DNA 的 OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> ≈ 1.6—1.8，RNA 的 OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> ≈ 1.8—2.0。当 DNA 样品溶液的 OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> > 1.8，表明 DNA 中混有 RNA，< 1.6 表明 DNA 中混有蛋白质。

3. 溴化乙锭荧光检测法：< 250 ng/ml、污染严重，1—5 ng

三、材料：实验四提取的 DNA

四、器材：

五、步骤：

稀释样品（98 μl TE + 2 μl DNA） → 空白调零 → 测定稀释样品 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的值 → DNA 浓度与纯度

[DNA] (ug/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 (ug/ml) × 稀释倍数

六、作业：

比较 DNA 测定的几种方法，完成实验报告。

## 实验六 PCR 扩增

教学方法：教师先用约 30 分钟的时间讲述实验的目的、原理、实验材料、器材、试剂、实验步骤、注意事项以及实验报告的要求等，重点或难点之处需要给学生做演示。然后学生自己动手实验，教师实时指导。

教学学时：2 学时

一、目的：了解并掌握 PCR 技术的原理及基本操作过程

二、原理：（黑板画图说明）

三、材料：实验四提取的大黄鱼肝脏的 DNA

四、器材：

五、试剂（PCR 体系）：

10×PCR 缓冲液

两端引物

dNTPs

Taq 酶

模板 DNA

ddH<sub>2</sub>O

六、步骤：ddH<sub>2</sub>O → 缓冲液 → 引物 → dNTPs → Taq → 混匀 → 分装 → 加模板

DNA（注意设对照） → PCR 仪上扩增 → 电泳检测结果

七、注意事项：防污染。

八、作业：完成实验报告（图片及结果分析）

## 实验七 琼脂糖凝胶电泳

教学方法：教师先用约 30 分钟的时间讲述实验的目的、原理、实验材料、器材、试剂、实验步骤、注意事项以及实验报告的要求等，重点或难点之处需要给学生做演示。然后学生自己动手实验，教师实时指导。

教学学时：4 学时

一、目的：了解原理；掌握分离方法；估测片段大小及 DNA 含量的方法

二、原理：讲述

三、材料：DNA 样品、PCR 产物、DL-2000 分子量标准品

四、器材：

五、试剂

六、步骤：

制胶：1.0%；琼脂糖要融化完全（透明）；加 EB 时注意防污染；倒胶时勿留气泡；胶要凝固完全后方可加样

加样：标准品（2.5ul）

电泳：电源勿接反（图示）

观察：

七、注意 EB 污染

八、作业：

完成实验报告

估测 DNA 片段大小和含量