

生物学实验 3 教学大纲

Course Outline

课程基本信息 (Course Information)					
课程代码 (Course Code)	BI281	*学时 (Credit Hours)	64	*学分 (Credits)	4
*课程名称 (Course Title)	生物学实验 3 Biological Experiments 3				
*课程性质 (Course Type)	专业基础实验课				
授课对象 (Target Audience)	致远学院三年级学生				
*授课语言 (Language of Instruction)	中文				
*开课院系 (School)	生命科学技术学院				
先修课程 (Prerequisite)	生命科学导论、生命科学导论实验、生物化学、生物化学实验、分子遗传学				
授课教师 (Instructor)	秦敏君	课程网址 (Course Webpage)			
*课程简介 (Description)	<p>生物学实验 3 (分子遗传学) 和其他生命科学分支学科一样, 是一门实验性很强的学科。分子遗传学实验是开展遗传学研究的重要基础, 是生命科学领域基础且重要的实验课程之一, 是生命科学、医学、农学等学科相关专业本科生的一门专业必修课程。主要从个体、细胞和分子三个不同水平揭示遗传学的基本现象和规律。</p> <p>实验课程内容包括三个模块, 一是经典遗传学模块, 主要利用果蝇野生型和突变型的杂交, 来验证经典的遗传学规律, 从个体水平上分析和深入理解遗传学基本原理; 二是细胞遗传实验模块。通过制备果蝇的唾腺染色体来观察巨大染色体和制备牛蛙骨髓染色体, 从染色体水平观察和理解遗传的染色体基础。三是分子遗传实验模块。学习和掌握基因定点突变的原理和方法, 在双子叶模式植物拟南芥中利用 cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) 系统, 定点突变氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 基因, 观察基因敲除植物的突变表型并进行 RT-PCR 验证。这些实验模块既有验证性实验也有综合型、探索性实验, 使学生从个体形态、细胞、染色体到分子水平, 逐步加深对遗传学理论知识和对遗传学各层次研究技术和方法的理解, 规范使用基本遗传学方法, 掌握先进的遗传学研究技术。</p> <p>通过分子遗传学实验的全面培养, 学生不仅理解遗传学知识, 掌</p>				

	<p>握先进的研究技术，还提高了分析问题和解决问题的能力，培养良好的科研素质，为今后独立开展相关科研工作打下坚实的基础。</p>
<p>*课程简介 (Description)</p>	<p>Genetics, together with other subjects in Life Sciences, contains many experimental researches. Genetics Experiments provides the key basis for genetics study. It is one of the most important courses in Life Sciences and is compulsory for the undergraduates in the subjects of Life Sciences, Medicine, and Agronomy <i>et al.</i> It reveals the essential phenomenon and principles in genetics.</p> <p>The course contains three modules: First, it is the classical genetics module, which test and verify the classical principles, analyze and understand the basic theory in individual level by the hybridization of wide with mutant fruit fly. Second, it is the cellular genetics module, which observe and understand the chromosomal basis of genetics by preparation of giant chromosome from fruit fly salivary glands. Thirdly, it is the molecular genetics module, which knocks out PDS gene in the model plant--<i>arabidopsis thaliana</i> using cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) system, observe the mutant phenotype and verify by RT-PCR. These give not only the validation experiments but also the integrated and exploratory experiments, which make students understand deeply the theory and relative technology from the individual, cellular, chromosomal to molecular levels. These experiments also help students grasp correctly the basic skills and advanced technology in genetics.</p> <p>After trained by Genetics Experiments, students can not only comprehend thoroughly the theory and grasp the advanced technology, but also analyze and resolve the problems effectively, promote the scientific quality, which lays a solid foundation for scientific work in future.</p>
<p>课程教学大纲 (course syllabus)</p> <p>一、经典遗传学模块</p> <p>实验 1. 果蝇的生活史、遗传性状观察与培养</p> <p>教学内容: 引导学生预习后讨论模式生物的定义，果蝇作为模式生物之一的优点，描述果蝇的生活史，果蝇成虫的雌雄区别，果蝇有哪些常见的突变性状。讨论如何饲养果蝇，如何观察果蝇。重点用图片和视频的方式帮助学生理解果蝇的变态反应过程；果蝇的麻醉方法；用体视镜观察果蝇性状的技术；区别雌性和雄性的性状；红眼和白眼，长翅、短翅和残翅，直刚毛和焦刚毛，横隔脉等野生型和突变型的性状对比；果蝇培养基的配制和果蝇的饲养方法。学生独立操作，观察野生型和三隐性突变体果蝇，探索适度和深度麻醉果蝇的方法，体视镜深入观察各性状，及时记录，并学会独立配置果蝇培养基，掌握接种和饲养果蝇要点。</p> <p>目的要求: 学生通过讨论和实验，系统地学习了果蝇整个生活周期、雌雄以及突变体的</p>	

特点，学会饲养管理技术。能够独自进行果蝇培养基的配制。会对果蝇进行适度麻醉、并在解剖镜下进行活体形态观察、雌雄和突变体性状的鉴别。能够独立进行果蝇的传代培养，并会严格处理死弃果蝇。

实验 2. 果蝇的伴性遗传分析

教学内容：引导学生预习讨论在科学发展的历史中，哪些科学家为性别决定和伴性遗传的理论做出了贡献。学习伴性遗传的特点，果蝇伴性遗传的规律以及卡方检测。学生分组合作，每 8 小时挑选一次处女蝇，完成亲本杂交，此后的每周固定时间开展子一代的观察和自交，子二代的观察。做实时记录，统计 500 只以上果蝇，计算并做统计学分析。

目的要求：学生通过讨论和实验，对伴性遗传进行了系统的学习，独立设计果蝇杂交方案。能够独立进行处女蝇的挑选和杂交，对产生的后代进行性状观察，对实验结果进行分析和卡方检测。

实验 3. 果蝇的三点测交和遗传作图

教学内容：引导学生预习并讨论，在 20 世纪初第一张 genetic map 的绘制情况，三点测交的原理，并发率和干涉等概念。设计实验进行果蝇的三点测交。重点讲述遗传作图的原理、果蝇三隐性突变体的遗传基础、野生型与突变型杂交的原理和方法、以及处女蝇的挑选技术，亲本杂交方法，子一代的性状分析和测交方法，子二代的性状分析方法和计算方法、基因作图方法。学生分组合作，每 8 小时挑选一次处女蝇，完成亲本杂交，此后的每周固定时间开展子一代的测交，子二代的观察。做实时记录，统计 1000 只以上果蝇，计算和绘图，并计算并发率和干涉。

目的要求：学生通过讨论和实验，对三点测交与遗传作图的原理其发现历史进行了系统地学习，独立设计果蝇杂交的实验方案。能够独立进行处女蝇的挑选并进行果蝇的杂交实验。会对产生的后代进行不同性状和性别观察、对实验结果进行统计分析和相关计算。在以后的科研工作中能够独立进行果蝇的相关实验操作。

二、细胞遗传学模块

实验 4. 果蝇唾腺染色体的制备与观察

教学内容：引导学生讨论果蝇唾腺染色体在遗传学研究上的重要作用，果蝇唾腺染色体的重要的结构特征，以及染色体的制片技术。重点通过图片讲述唾腺染色体的研究历史、形成机制、形态结构、命名和形态特征（巨大染色体、多线染色体、染色体联会、横纹特征和 puff 结构等）。果蝇三龄幼虫的挑选、唾液腺的分离、漂洗、低渗、染色、压片和镜检技术。学生独立操作，挑选三龄幼虫开展耐心且细致的操作，按实验步骤进行染色体制片，详细观察唾腺染色体的具体特征，完成实时记录。学生对实验结果进行镜检观察并相互分析与比较实验条件对结果产生的影响，及时记录数据和拍照，提交照片。引导学生讨论产生最佳结果的条件和原因，总结经验。

目的要求：学生通过讨论和实验，掌握有效分离果蝇幼虫唾腺的技术和制作唾腺染色体标本的方法。能够解体细胞染色体联会现象，观察果蝇唾腺染色体的形态特征，并根据唾腺染色体上带纹的形态和排列，能够识别不同的染色体和染色体结构变异的细胞学表现，能够绘

制出清晰的多线染色体图，理解遗传规律的染色体基础。

实验 5. 牛蛙骨髓细胞染色体的制备和观察

教学内容：引导学生讨论染色体的制备原理、Giemsa 显带的原理、染色体的显带技术和带型分析原理。重点讲述染色体的制片技术、染色体显带技术和多种带型分析如 G、Q、R、C、T、N 带等。具体分析各种带型，展示图片、原理和相关应用。举例分析染色体特征和命名原则。学生分组，解剖实验动物如牛蛙，取出动物的大型骨骼，用生理盐水抽提骨髓细胞，进行固定、低渗、滴片处理，讨论制定方案，优化实验条件，反复练习滴片技术，对染色体进行滴片并进行染色，用光学显微镜观察染色体制片，寻找分裂相最好的染色体，拍照计数，分析实验细节和不同的条件对染色体制片结果产生的影响。

目的要求：学生通过实验，系统地学习有丝分裂中期染色体的制备方法和各种显带技术，包括 G、R、N、T 带等，明确各种显带技术的原理及其应用，会将其应用在具体的科学研究中。学生可以独自利用染色体的制备原理进行真核生物有丝分裂中期染色体的制备操作，获得分裂相较好的染色体标本片。为进一步的核型分析、荧光杂交等实验奠定基础。

三、分子遗传学综合实验模块

实验 6~10. 利用 CRISPR/Cas9 系统进行拟南芥氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 基因的定点突变

教学内容：CRISPR/Cas9 系统是细菌在噬菌体长期选择压力下进化出来的一种有效抵御外源 DNA 入侵的免疫机制之一。在菌体内，CRISPR 簇在其前导区的调控下转录成 precrRNA，在 tracrRNA 和 Cas9 参与下加工成成熟的 crRNA，并引导 crRNA/tracrRNA/Cas9 复合体识别结合外源 DNA 特定序列，剪切 DNA 双链，沉默外源基因的表达。基于此种原理，CRISPR/Cas9 系统被开发成一种新型的基因打靶系统。相对于稍早的 RNAi、Cre/LoxP、ZFN 和 TALEN 系统，此新型打靶系统具有操作简单、效率高、成本低、可同时沉默任意数量的基因等优点。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)，是一种广泛分布于亚洲、欧洲以及北非地区的小型开花二年生草本植物，高 7~40 厘米，春型拟南芥萌发后 3 周左右就可开花，能在 6 周内完成一个世代，是实验教学的好材料。

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌，它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位，并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌中细胞中分别含有 Ti 质粒和 Ri 质粒，其上有一段 T-DNA，农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后，可将 T-DNA 插入到植物基因组中，并且可以通过减数分裂稳定的遗传给后代，这一特性成为农杆菌介导法植物转基因的理论基础。人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区，借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合，然后通过细胞和组织培养技术，再生出转基因植株。

植物基因遗传转化的关键环节之一在于用合适的选择标记基因把极少数的转化子从未转化细胞中筛选出来，或者是杀死未转化细胞，或者是给转化细胞以生长优势，或者使之有明显的表型特征。通常所利用的选择标记基因有潮霉素抗性基因 *hpt*、卡那霉素抗性基因 *npt II*、除草剂抗性基因 *bar*，这些筛选系统的原理都是未转化细胞被杀死，转化细胞能将筛选剂分解为无毒物质而得以生存繁殖。

此综合实验首先从拟南芥的种植与培养开始，然后选择靶点，设计引物，构建 CRISPR 定点突变系统：MH 载体酶切，PCR 扩增 PDS 基因，利用新型基因打靶系统 CRISPR/Cas9 系统

构建 CRISP-PDS 载体，并进行质粒验证。此后，转化农杆菌，然后对含 CRISP-PDS 构建的农杆菌进行 PCR 验证，再转化拟南芥，继续培养并收集种子。播种，待拟南芥生长，筛选出阳性转化子并用 RT-PCR 进行表达模式分析。

引导学生预习并讨论 CRISP/Cas 9 定点突变系统的原理、拟南芥作为模式生物的重要性、农杆菌介导植物转基因的原理、转化子的筛选原理和反转录 PCR 验证实验结果的原理等。帮助学生制定整体实验过程和步骤。学生分组，开展植物培养基的配制、拟南芥的种植、质粒的抽提、酶切与连接、PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、电击转化克隆、RT-PCR 具体等操作，实时指导学生，解答问题，提供充足的试剂。要求学生在整个实验过程中详细记录实验步骤和各项数据，及时对数据进行分析比对并讨论，在实验结束时，组织学生分组汇报，总结各自的实验过程和结果，讲述实验成功与失败的经验教训，对实验的深入认识和改进措施。

具体安排为：

实验 6. 实验原理讨论、培养基的配置与拟南芥的培养

实验 7. 定点突变载体的构建（上）——质粒抽提、酶切、PCP 扩增

实验 8. 定点突变载体的构建（下）——连接、转化、鉴定、测序

实验 9. 转化农杆菌及鉴定

实验 10. 转基因定点突变拟南芥和转化子筛选

注：由于该实验历时较长，果蝇培养与杂交实验也要历时 1 个月，因此 CRISP 定点突变综合实验需要与果蝇培养与杂交实验同时开展。

目的要求：学生通过讲解、查阅文献，学习和掌握基因定点突变的原理和方法，并在老师和助教带领下进行探索性实验操作，熟练掌握植物分子生物学的各种技能，探索各种条件如引物、PCR 条件、转化条件等对实验结果的影响，对结果进行总结与分析，训练学生的科研思维能力，最终各自建立一个成熟的定点突变敲除拟南芥 PDS 基因的模型，并进行汇报答辩，以论文形式提交实验报告。

<p>*学习目标(Learning Outcomes)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 配合分子遗传学的理论学习，帮助理解遗传学规律和理论知识，加深记忆。 2. 熟练掌握和规范使用遗传学研究的基本技术，学习并会独立使用当前先进的研究方法和技能。 3. 开展文献阅读、小组讨论、课上汇报，能够围绕课题自学并制定研究方案，提高团队合作能力和流利的语言表达能力。 4. 通过综合型、探索式实验的训练，培养和提高实验设计能力、深入探索和优化实验的能力、科学的思维能力、比较和分析问题的能力。 5. 通过实验课程的训练，具备全面的科学研究素质和创新能力，为进一步开展创新研究打下坚实的基础。 					
---------------------------------	---	--	--	--	--	--

<p>*教学内容、进度安排及要求 (Class Schedule & Requirements)</p>	<p>教学内容</p>	<p>学时</p>	<p>教学方式</p>	<p>作业及要求</p>	<p>基本要求</p>	<p>考查方式</p>
	<p>果蝇观察与培养</p>	<p>4</p>	<p>学生汇报、授课、实践</p>	<p>预习报告、实时记录和实验报告</p>	<p>围绕题目预习，分组准备 PPT，课上汇报与讨论</p>	<p>综合考察</p>
	<p>果蝇伴性遗传分析</p>	<p>6</p>	<p>学生汇报、授课、实践</p>	<p>预习报告、实时记录和实验报告</p>	<p>围绕题目预习，分组准备 PPT，课上汇报</p>	<p>综合考察</p>

					报与讨论	
	三点测交和遗传作图	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	果蝇唾腺染色体的制备和观察	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	牛蛙骨髓细胞染色体的制备与观察	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	拟南芥的种植与培养	4	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	扩增PDS基因, 酶切载体	8	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	连接并转化, 挑选阳性克隆鉴定	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	质粒验证及农杆菌转化	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	转基因、转化子筛选	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
	转化子表型观察、RT-PCR验证	6	学生汇报、授课、实践	预习报告、实时记录和实验报告	围绕题目预习, 分组准备PPT, 课上汇报与讨论	综合考察
*考核方式 (Grading)	<p>本实验课程单独设课, 单独考核评分。对学生的成绩考核按百分制计算, 由7个方面组成: 按时上课占5%, 预习与汇报占15%, 实验操作占10%, 实验结果占10%, 实时记录占10%, 实验报告占30%, 期末考试占20%。</p>					

*教材或参考资料 (Textbooks & Other Materials)	乔守怡, 遗传学分析实验教程. 北京: 高等教育出版社, 2008。 王金发、戚康标、何炎明主编。遗传学实验教程。北京: 高等教育出版社, 2008
其它 (More)	无
备注 (Notes)	无