

## 粗糙脉孢菌顺序四分子分析

### 实验材料：

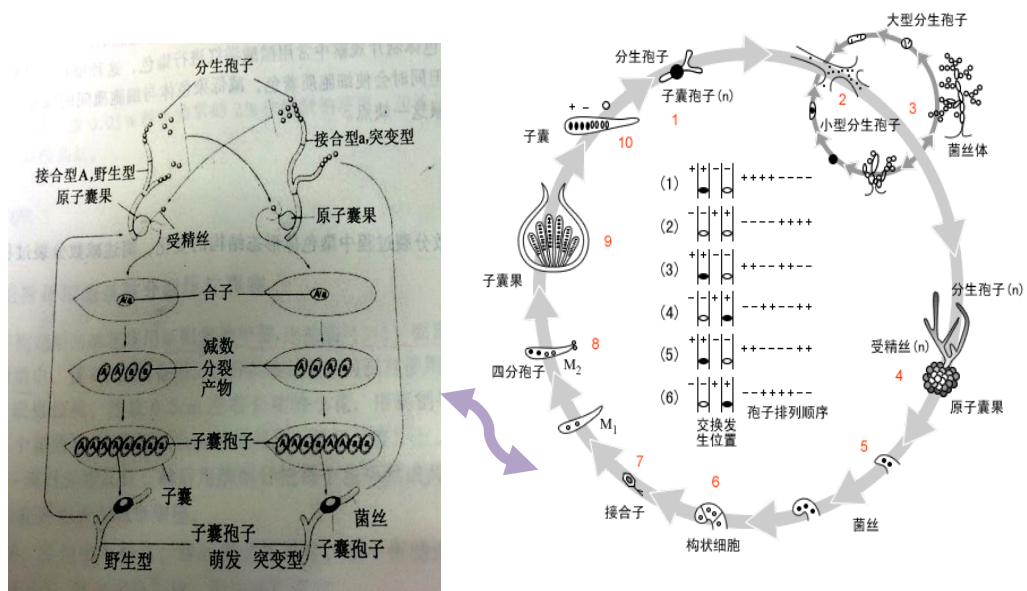
粗糙脉孢霉 ( $lys^+$  野生型) *Neurospora crassa* CCTCC AF 2014012

粗糙脉孢霉 ( $lys^-$  缺陷型) *Neurospora crassa* CCTCC AF 2014014

### 粗糙脉孢霉的性质与生活史：

粗糙脉孢霉属于真菌中的子囊菌纲，是低等的真核生物。每一菌丝细胞中含有几十个细胞核。是遗传分析好材料：子囊孢子是单倍体，其表型直接反应其基因型；一次只分析一个减数分裂的产物；体积小，易培养，繁殖快，一次杂交就能产生大量的后代，便于获得正确的统计学结果；能进行有性生殖，其染色体的结构和功能类似于高等动植物；更加重要的是，子囊孢子在子囊中的线性排列顺序与减数分裂中期染色体在赤道板两侧的排列顺序相同，这就是粗糙脉孢霉成为了遗传分析的好材料。

粗糙脉孢霉的生活周期如下图：



粗糙链孢霉有有性生殖和无性生殖。

粗糙脉孢菌  
(*Neurospora Crassa*) 的生殖方式

**无性世代 (单倍体世代):**

菌丝体 → 分生孢子 → 菌丝体。

**有性世代 (双倍体世代):**

一个交配型的分生孢子落在另一交配型原子囊壳受精丝上, 从而进入原子囊 (子实体), 进行多次有丝分裂, 形成多个单倍体核, 这些单倍体核与子实体中的单倍体核融合, 形成多个二倍体核, 然后进入减数分裂, 每个二倍体核形成 4 个单倍体核。再进行一次有丝分裂。形

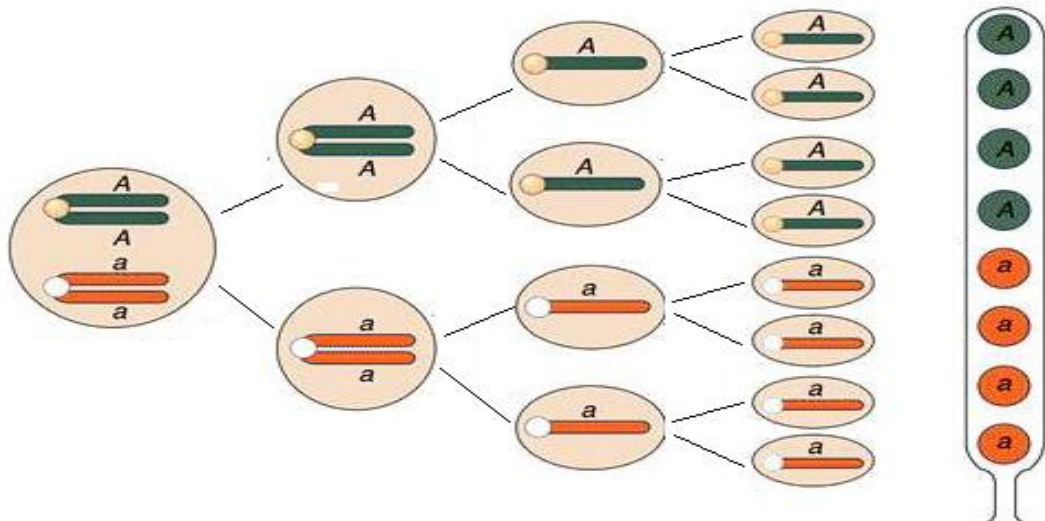
### 着丝粒作图与遗传分析:

利用四分子分析法, 测定基因与着粒间的距离称为**着丝粒作图**。

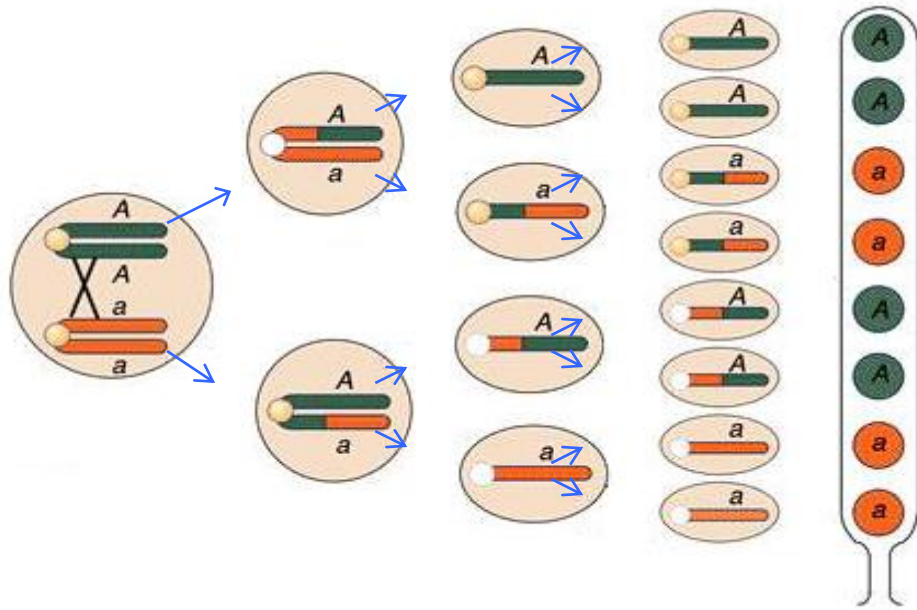
着丝粒作图是基于这样的事实: 减数分裂中在同源染色体的一对非姊妹染色单体的着丝粒和某杂合基因座间有没有发生交换, 和其产物四分子中的等位基因在排列方式上是不同的。可分为两种:

没有发生交换的产物为第一次分裂分离 (first division segregation) 或叫 M<sub>I</sub> 模式;

发生了交换的产物为第二次分裂分离 (second division segregation) 或称为 M<sub>II</sub> 模式



非重组型子囊: 目的基因与着丝粒之间未发生重组



重组型子囊：目的基因与着丝粒之间发生重组（图示一种可能性）

利用四分子分析，测定基因与着丝粒间的距离，即根据子囊孢子基因型的排列顺序，计算基因与着丝粒的重组率，确定基因与着丝粒之间的距离和排列顺序。

**基因与着丝点间距离的计算：**

子囊类型	孢子排列方式	分离类型	观察数	合计
1	++++----	第一次分裂分离		
2	----++++			
3	++--++--	第二次分裂分离		
4	--++--++			
5	++----++			
6	--++++--			

$$\text{重组值} = \frac{\text{交换型子囊数} \times 1/2}{\text{交换型子囊数} + \text{非交换型子囊数}} \times 100\%$$

## 实验步骤:

### 1. 杂交接种与培养:

野生型菌株 (Lys<sup>+</sup>, A) × 缺陷型 (Lys<sup>-</sup>, a)

### 2. 压片观察子囊: (注意观察时期)

- 1) 将附有子囊果的滤纸放入装有来苏尔溶液的培养皿中
- 2) 取一张载玻片, 滴 1-2 滴来苏尔, 用接种针将子囊果挑出, 放在载玻片上
- 3) 盖上另一张载玻片, 用手指压片, 将子囊果压破
- 4) 显微镜观察, 统计各种类型子囊的数量, 每人统计 200 个左右的子囊

## 教学建议:

### ✿ 粗糙脉孢霉培养基 (PDA 培养基)

马铃薯浸取液 1L

[注] 马铃薯浸取液: 取去皮马铃薯 200g, 切成小块, 加水 1.0 升煮沸 30 分钟, 滤去马铃薯块, 将滤液补足至 1.0 升。

葡萄糖 20g

琼脂 15g

自然 pH

按上述配方配制 PDA 培养基, 也可以通过试剂公司购买合成的 PDA 培养基, 按说明书配制。

### ✿ 粗糙脉孢霉杂交培养基

斜面的配制: 按比例取用上述培养基, 加入琼脂后需加热沸腾至琼脂完全溶解于马铃薯浸取液中, 然后分装至试管。试管规格: 18\*180, 每支试管加入 10ml 上述琼脂完全溶解的培养基液体。121 度, 灭菌 20min。灭菌完成后热迅速加入 100ul 赖氨酸 (100mg/ml) 溶液至每支试管, 混匀后摆制斜面。

赖氨酸溶液的配制方法: 取 0.5g 赖氨酸粉末溶解于 5ml 无菌水中, 待完全溶解后取 0.22um 孔径的过滤器进行过滤除菌后备用。

### ✿ 最佳保存条件: 不用于实验时, 可于室温保存 2 周左右。

## 实验教材:

王建波, 方呈祥《遗传学实验教程》武汉大学出版社 2004, 64-67.