

枪头、PCR 仪，水平电泳槽、电源、凝胶成像系统

抽提缓冲液、裂解液、24: 1 氯仿/异戊醇、75%乙醇、异丙醇、Taq 酶以及反应缓冲液、 Mg^{2+} 、dNTP、去离子水、矿物油、溴化乙锭、琼脂糖、 $0.5\times TBE$ 缓冲液

五、试验方法与步骤

(一) 棉花 DNA 提取

1、抽提缓冲液、裂解液的配置

抽提缓冲液 (PH7.5) 1L:

0.35 M 葡萄糖 (69.36 克); 0.1M Tris-HCl (12.44 克); 0.005M Na_2EDTA (1.86 克); 2%(W/V) PVP K-30 (20 克) 0.1% DIECA (2 克)

使用前加 β -巯基乙醇至 0.2% , PH 调至 7.5。

抽提裂解液(PH 8.0): 1L

0.1M Tris-HCl (12.44 克); 1.4M NaCl (81.816 克); 0.02 M Na_2EDTA (7.45 克); 2% CTAB (20 克); 0.1% DIECA (1 克); 2% PVP K-30 (20 克)

加 0.2% β -巯基乙醇后调 PH 值至 8.0。

2、抽提步骤

- (1) 取幼嫩叶片于研钵中，加预冷的抽提缓冲液，充分迅速研磨。
- (2) 用剪宽了的 200 μ L 枪头将研磨液吸入 1.5mL 离心管中，4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 10 分钟。
- (3) 取上清至一新的 1.5mL 离心管中，加 400 μ L 预热到 65 $^{\circ}$ C 的裂解缓冲液,并迅速搅拌均匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。每隔 10 min 轻轻摇动一次。
- (4) 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1)，轻轻上下颠倒混匀至溶液成一相。
- (5) 室温 12000g 离心 10 分钟。
- (6) 用剪宽了的 200 μ L 枪头取上清至新管，重新加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1)，轻轻摇动直至混匀为一相。
- (7) 室温 12000g 离心 10 分钟。取上清至新管，加入 2/3 体积冰冷的 (-20 $^{\circ}$ C) 异丙醇，轻轻上下颠倒混匀，这时会出现絮状的 DNA 沉淀。 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 30 分钟。
- (8) 将 DNA 转移至新管，用 75%乙醇浸泡来洗盐和去杂，2~3 次。倒掉乙醇，将 DNA 风干，用 200 μ L PH8.0 的 TE 溶解。
- (9) DNA 质量的电泳检测。吸取 2 μ L 的 DNA 在 1%的琼脂糖上检测。

(二) SSR 操作

分子标记技术操作分三步走，即 PCR 扩增、电泳分离、结果检测。

(1) SSR 的 PCR 扩增:

SSR 反应体系: (20 μ L)

组分:	体积
DNA(10ng/ μ l)	3 μ l
正向引物 (2.5 μ M)	2 μ l

反向引物 (2.5uM)	2ul
Taq DNA polymerase (5U/ul)	0.2ul
dNTPs(10mM)	0.2ul
10×Buffer	2.0ul
Mg ²⁺ (25mM)	1.5ul
ddH ₂ O	9.1ul

PCR 扩增程序: 94°C 3min,
94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 34 循环,
72°C 10min
4°C 保存

- (2) 电泳分离: 3%琼脂糖, 100V 恒压电泳至溴酚蓝到凝胶前端。
- (3) 紫外灯下观测结果。
- (4) 条带记录。对于 F2 群体, 亲本一的条带记为 A, 亲本二的条带记为 B, 杂合型的记为 H, 缺失记为一。

《昆虫的内部器官 I》实验简介

一、目的要求

了解昆虫各内部器官的位置；掌握昆虫消化、排泄、生殖系统的位置及其主要构造。

二、实验材料和用具

材料：雌、雄棉蝗成虫浸泡标本

用具：蜡盘、大头针、镊子、剪刀、双目解剖镜、解剖针、手持扩大镜等。

三、实验步骤

取浸泡棉蝗成虫 1 头，剪去足和翅，从肛门起沿背部一侧表皮下剪至颅部，用大头针沿剪口斜插将棉蝗成虫固定在蜡盘上，顺序观察昆虫各内部器官的位置，掌握昆虫消化、排泄、生殖系统的位置及其主要构造。

1、消化系统

消化道前端开口于肛门，纵贯于体腔中央。

前肠 由咽喉、食道(弯曲的短管状)、嗦囊(膨大部分)、前胃(前伸胃盲囊所包围部分)组成。

中肠 由中肠(前、后伸胃盲囊交界部至马氏管着生部)、胃盲囊(6 对)组成。

后肠 由回肠、结肠、直肠组成，末端开口于肛门。

注意观察前、中、后肠各部分组成及形状。各部如何划分？胃盲囊、马氏管形状如何？

2、排泄系统

马氏管为主要排泄器官。在消化道中、后肠交界处有若干游离于体腔的黄白色细管，即马氏管，其一端与消化道相连，另一端封闭。

3、生殖系统

(1) 雌性生殖系统

雌性在消化道背面有 1 对并列卵巢，卵巢由若干卵巢管组成，管中纵列若干肾形卵，卵巢管与各侧的 1 条输卵管相通，左右侧输卵管伸向消化道腹面，与中输卵管相接（观察完消化道后，去掉消化道方可见），其开口为生殖孔。中输卵管顶端有一盘曲管状的贮精囊。卵巢前端有一根短小曲折的管状附腺。

(2) 雄性生殖系统

雄性在其背侧面有 1 对睾丸，睾丸由多条睾丸管组成，分别与左右输精管相通，左右输精管亦围绕消化道在其下与一射精管相连。射精管顶端有贮精囊，尚可见副腺相连。射精管开口于体外。

四、作业与思考题

1. 通过观察，说明棉蝗成虫内部器官分为哪几个系统，各系统在体内位置如何？
2. 绘出棉蝗成虫的消化系统，标明各部名称，并说明各部功能。
3. 绘出棉蝗成虫雌雄生殖系统，标明各部名称。

《植物光合速率的测定》实验简介

一、目的要求

学习光合作用测定仪的操作、使用以及掌握植物光合作用的测定方法。

二、基本原理

光合作用测定仪是利用红外线 CO_2 气体分析仪，通过测定反应系统中的浓度变化，来测定植物的光合速率。

CO_2 在 $2.69\mu\text{m}$ 、 $2.77\mu\text{m}$ 、 $4.26\mu\text{m}$ 和 $14.99\mu\text{m}$ 处对红外线有最大吸收峰，其中在 $4.26\mu\text{m}$ 的吸收不与 H_2O 对 CO_2 的吸收重叠，当该波长的红外线经过含有 CO_2 的气体时，能量因被 CO_2 吸收而降低，并服从朗伯—比尔定律，红外线检测器可通过检测红外线能量的变化而测定出 CO_2 的浓度变化。

PPS CIRAS-1 光合作用测定仪为开放式气路（图 1）。含有 CO_2 的外界空气分别流经参比室和叶室，经红外 CO_2 分析仪分析参比室和叶室 CO_2 的浓度差后即可根据叶面积计算出叶片的光合速率。

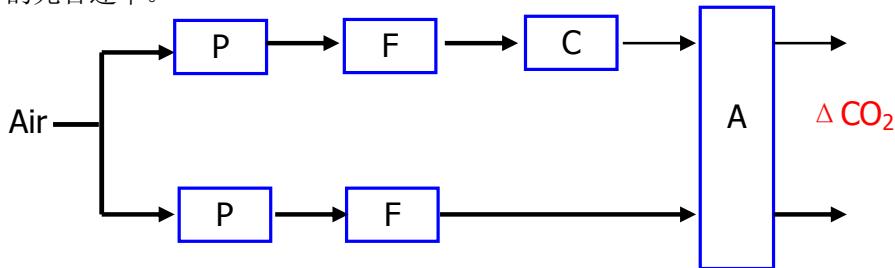


图 1 光合作用测定仪开放式气路工作模式图

CIRAS-1 系统中同时具有水气分析仪，通过分析参比气与分析气中水蒸汽的浓度差便计算出叶片的蒸腾速率。

三、主要器材

PPS CIRAS-1 光合作用测定仪主机；叶室；充电电池；充电器；橡胶软管；气体缓冲瓶等。

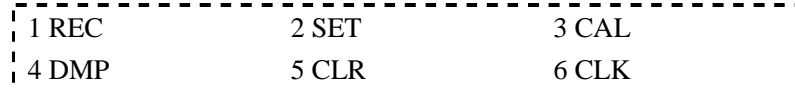
四、实验材料

棉花等作物叶片。

五、操作步骤

1. CIRAS-1 光合作用测定仪的参数设置与预热

- 首先将气体缓冲瓶与主机上“air”空气入口连接后，再将叶室与主机相连。
- 打开主机电源，大约 7s 后出现如下主菜单。



- 按 1 选择记录状态（REC），然后出现下一级菜单。

- (4) 按 **1** 选择叶室自动识别 (**AUTO**), 然后出现叶室类型选择菜单。
- | | |
|--------------------|-----------|
| PLC 1: AUTO | 2: CPY |
| 3: STND | 4: AS SET |
- (5) 按 **1** 进入叶室类型确定菜单 (B/R—阔叶/条形叶), 随后出现光源类型选择菜单。
- | | |
|----------------|---------|
| 1: BROAD | 2: RICR |
| 3: LARGE BROAD | |
- (6) 按 **1** 选择外部光源 (SUN AND SKY—太阳光), 随后出现测定方式选择菜单。
- | | |
|-------------|-----------|
| PLC5 1: B/R | 2: N |
| 3: C/P | PLC5 4: U |
- (7) 按 **1** 选择测量方式 (M—手动), 随后出现参数确认菜单。
- | | |
|---------|-----------|
| 1REC: M | 2INT: 2 |
| 3PMP: I | 4FLO: 200 |
- (8) 按 **Y** 确认如下参数 (如需改动则选择进入下级菜单进行操作)。
- | | |
|-----------|-----------|
| 1RB: 0.30 | 2TL: RAD |
| 3T: 0.17 | 4A: 002.5 |
- (9) 按 **Y** 出现如下菜单 (1P—数据存贮区位; B—电池电压; 2Z: 1—仪器自动调零; 3Q—光源辐射强度)。
- | | |
|------------|-----------|
| 1P: 01 :89 | B: 12.2 |
| 2Z: 1 | 3Q: 0 438 |
- (10) 按 **Y** 确认后, 随后则依次如下信息。
- | | | |
|----------------------|--|--|
| WARM UP DELAY | | |
| ZERO MODE | | |
| ZERO ENDED | | |
- (11) 仪器预热 10min 后, 则显示如下测定结果观察状态窗口, 然后即可进行测定。
- | | | |
|------------------|-----------------|---------------|
| E: nn.nn | G: nnn | TL: nn |
| A: ± nn.n | Ci: nnnn | 10 |
- (E—蒸腾速率 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; G—气孔导度 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; A—光合速率 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Ci—胞间 CO_2 浓度 ppm)

2. 材料的选取及光合速率测定

从上而下选择棉花的功能叶片—倒 4 叶, 打开叶室夹好叶片后, 保持叶室进光窗与外界光源垂直, 待光合速率 (A) 相对稳定后, 记录叶片的光合速率、蒸腾速率等。

每处理至少重复测定 3 次以上, 计算、比较不同处理的棉花叶片之间光合速率有误差, 并分析原因。

3. 测定完毕, 按主机操作面板上的“N”退回到主菜单, 关闭仪器电源。