

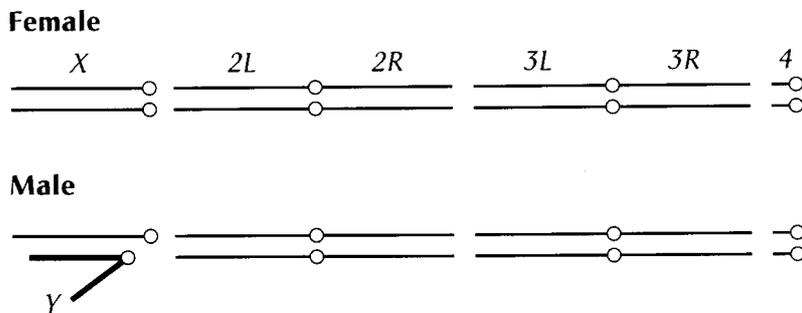
- §1.1 果蝇染色体
- §1.2 识别标记
- §1.3 命名
- §1.4 什么使果蝇如此伟大？平衡染色体
- §1.5 解密交配方案
- §1.6 基本果蝇管理
- §1.7 精心于难养品系
- §1.8 为杂交收集果蝇

第一章 遗传杂交的基础知识

在过去的 85 年里，果蝇遗传学已经发展成为一门艺术。这部分是由于时间和信息积累的结果，更多是一些新的遗传学工具和一些果蝇生物学本身特征的结果。净效果是使杂交方案更可靠，减少了减数分裂重组中的随机性，同时基因在染色体上的物理位置也更容易确定。以下几节介绍一些果蝇遗传学的基本知识和如何饲养果蝇以及果蝇的命名。

§1.1 果蝇染色体

果蝇有四条染色体，通常用直线和圆圈来分别代表染色体臂和着丝粒：



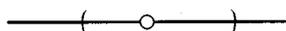
“L”代表左臂，“R”代表右臂。X和第四条染色体有较长的左臂和很短的右臂（一般不画出来）。X、2L、2R、3L、3R大小基本相当，而第四染色体则只有它们的1/5长。

果蝇的性别决定是基于X染色体和一套常染色体的比率。雄蝇中一条X和两套常染色体的比例是0.5，而雌蝇的比例为1。Y染色体上只有几个基因，除了影响精子正常活动能力外，对雄蝇发育的很多方面是没有必要的。

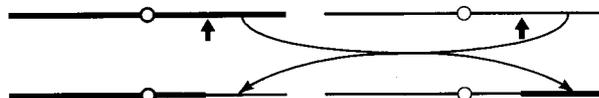
果蝇遗传学的一个重要特征是雄蝇中完全没有重组现象。尽管重组在别的物种的异配性别中常常会低些，但果蝇却为 0。可是染色体重组在雌性果蝇中却是正常存在的，不过它可以利用果蝇实验者最独特的工具---染色体平衡子来控制。由射线引起大量断裂和重接使平衡染色体中整个正常染色体的顺序被搞乱了，在减数分裂前期不能和正常同源染色体配对和重组了。果蝇中的平衡子可以通过显性和隐性突变来识别。因此它们从亲代到子代的传递方向可以很清楚地分辨出来，由于它们完全不与其同源染色体重组，故其同源染色体的去向亦可相应地推断出来。由于同源染色体可靠分离，即使其同源染色体没有显性标识也照样可以判断出来。若子代未获得平衡染色体，则必获得其同源染色体。这是果蝇杂交方案中最重要的原理。

本章将要详细讨论的平衡子是大量重排（倒置）染色体中的一个特例。其它将会在以后的讨论中出现的重排有：易位，复合染色体，缺失和重复。几种主要重排种类列于下：

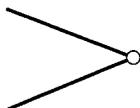
- 倒置：其中在同一染色体上发生两次断裂和修复事件，导致出现一个倒置片段（断点用括号表示）。



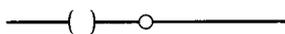
- 易位：两条染色体上发生断裂和修复，结果是两个片段发生交换。



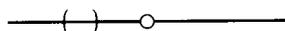
- 复合染色体：两条左臂或两条右臂连在同一着丝



- 缺失：同一条染色体上发生两次断裂，修复时除去了中间片段。



- 重复：切除的片段插入到另一条染色体上形成双倍



果蝇的另一个重要特征是唾液腺中的多线染色体。其上有高分辨的带状图案。早些时候，人们将基因的作图位置和染色体的物理特征联系起来，并确定

染色体重排的断点位置。在分子时代，它们有助于克隆序列的物理定位。每条主染色体臂分为 20 个编号的片段，X 为 1-20，2L 为 21-40，2R 为 41-60，3L 为 61-80，3R 为 81-100，第 4 条染色体为 101-104。每一片段又按字母顺序分为几个区，每个字母编号的区再分为数字编号的带。

§1.2 识别标记

带有标记的突变体是解释基因型的关键。有时它们用于标记你所想要研究的那条染色体，但它们更多的是标记你想丢掉的那条染色体。大批突变体影响眼的颜色、眼的形状、翅膀形状、翅膀脉络、刚毛颜色、刚毛形状和表皮色素形成，这几种主要表型用于标记不同的染色体臂。

突变体表型的描述可见于 Lindsley 和 Zimm 的书。在本书的插页中也画了一些最常用的标识。只需多看几眼便可认识。但有关这些标识表达的一致性和它们之间的相互作用应该牢记。

表达的一致性反映了由果蝇突变基因的基因型表现出的表现型的可能性，如果突变基因型表现出一定的表现型，其表现型又将在怎样一个范围内表现。用来描述突变的“等级”包含了这些参数，最高的是指极端的一致状态。当通过标识选择突变体时，一定程度的不一致性是可以允许的。最坏的情况就是漏掉一些果蝇。可是当你不想要某一标识的果蝇时，那就危险的多。在这种情况下，必须严格保持基因表现的一致性---至少对那些不一致性心里应该有底。这能帮你分辨出那些标识可能有问题。

当你同时使用两个影响同一性状的突变标识时，它们之间的相互作用就显得十分重要。比如，当使用了两个都影响刚毛形状的突变时，搞清楚双突变是怎样的，是否能与单突变体区分开是很重要的。这些信息一般在红皮书中是找不到的。你要靠自己的经验了。

§1.3 命名

毛主席语录：果蝇命名是纸老虎。

果蝇遗传学可以简化成一些简单的规则，下面举例说明：

1. *f; cn bw; TM2/tra*

本例说明以下几点：

- 只有染色体上有某种突变才写上它的基因型，染色体按 X/Y; 2; 3; 4 顺序排列，此例中 *f; cn bw; TM2/tra* 分别指 X，第 2，第 3 染色体。

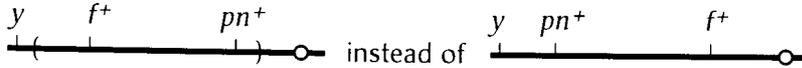
- 果蝇基因型一般用斜体表示；突变体名称一般不用斜体，尽管有些杂志至今还这样做。本书按惯例行事。
- 突变体简写一般不超过 3 个字母，*f* 代表 *forked*，影响刚毛的形态；*cn* 代表 *cinnabar*，*bw* 代表 *brown*，它们都影响果蝇眼的颜色，共同作用时形成白眼；*TM2* 指平衡染色体“third multiple#2”；*tro* 是 *transformer* 参与性别决定。
- 小写字母代表隐性表型，大写为显性，基因命名根据酶或蛋白质（例如 *Adh* 代表乙醇脱氢酶）或根据特殊染色体的重排(平衡染色体 *TM2*)。
- 基因符号间的分号表示不同的染色体。例如，上面提到的基因型分别在 X; 第 2; 第 3 染色体上。
- 重排染色体后面的逗号表示后续基因也在此染色体上（例如 *TM2* 的全称是 *TM2, Ubx* 因为它带一个突变的等位基因 *Ultrabithorax*）。
- 染色体基因型写成一行表示此基因型是纯合型，杂和型则写成两行，每一行对应一条同源染色体。
- 任何未写明的均表示野生型；因此 *f* 代表 X 染色体带有 *forked* 的等位基因；X 染色体的其它位点被认为是野生型；杂合时只标出每个染色体的突变位点。

$$2. \frac{C(1)RM, y^2}{Y}; \frac{In(2LR)O, Cy}{Sco}; \frac{ci^D}{ey^D}$$

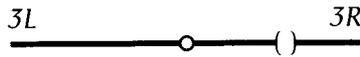
- *C(1)RM* 表示一个复合染色体。*C(1)*表示是第一染色体的复合染色体，*RM* 代表着丝粒反向居中，即着丝粒在染色体中间，一条臂与另一条臂方向相反（即它们用相同的那一端连在着丝粒上），一般记为 $X^{\wedge}X$ 或 *attached--X*。
- 这特殊的联体是 *y*² 等位基因的纯合子（发现的第二个等位基因），使表皮颜色为黄色和黑色刚毛，这与 *y* 不同，后者具有黄色表皮和刚毛。
- 由于联体包含两条同源的 X 染色体连接在同一个着丝点上，它们之间不会发生分离，通常，这些果蝇在保存时，雌雄果蝇都带有 Y 染色体；这是为了保证所有的雄性果蝇都是可育的。（Y 染色体的有无与性别决定无关，并且对雌性的两条 X 染色体无影响，但对精子的活动力有影响。由于在雄蝇中 X 和 Y 分离，它们的儿子获得 Y 染色体的唯一途径是从其母处获得。这样就保证了所有的果蝇都有 Y 染色体。）
- 此种第二染色体基因型杂合体：一个是平衡子 *In(2LR)O, Cy*，带有翘翘显性突变，另一条染色体带有显性突变 *Sco*，它没有胸部的毛；*In(2LR)* 指的是第二条染色体上的左臂和右臂间的倒置。
- 最后一个染色体基因型是指第四染色体，是等位显性突变的杂合体，对于这两个基因的其它等位基因大多是隐性的。这里例外用大写的上标 *D* 来表示显性，而不是按惯例将突变名称大写。由于这两个等位基因是纯合致死的，故所有的果蝇都保持这两个基因的杂合态。

- 染色体重排通过缩写符号后面跟相关染色体编号和重排名称来表示。例如：

In(1)sc4 X 染色体上被称为“scute-4”的倒置，由于断点在scute位点上而产生的突变表型。



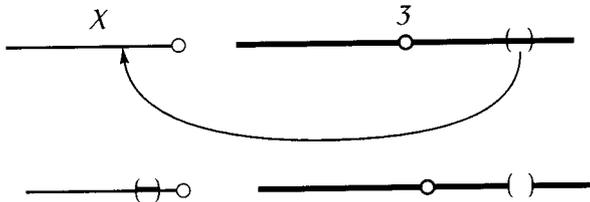
Df(3R)P14 第3染色体右臂部分缺失，P14代表Pasadena-14



T(1;4)Bs 1,4染色体间易位，各有一个断点和相互重新连接，造成严重的棒眼表型，叫Stone(B^s)

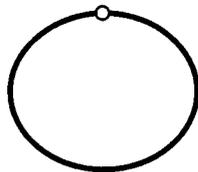


Tp(3;1)ry³⁵ 第三染色体的一个片段转座到X上，其中一个断点产生眼颜色突变表现型；有时称为易位Tp(3;1)ry³⁵；转座有时指一个片段从同一染色体一处移到另一处；当此X染色体在第三对染色体正常的果蝇中存在时，就成为重复，记为Dp(3;1)ry³⁵



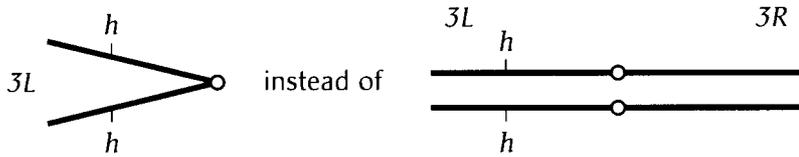
R(1)W^{vC} 环X，没有自由末端的X染色体，本例中有白眼基因的异常表达。

V—variegation, C—catcheside



C(3L)RM, h 由第三染色体两条左臂组成的复合染色体，又称 attached-3L，它是突变等位基因 hairy 的纯合体，使果蝇颈和头部多毛。RM 指着丝粒反向居中；第三染色体的两条左臂连在同一条染色体上，而非各自通过着丝粒与右臂相连；Metacentric 指着丝粒在染色体的中间，reversed 指两条 3L 是通过着丝

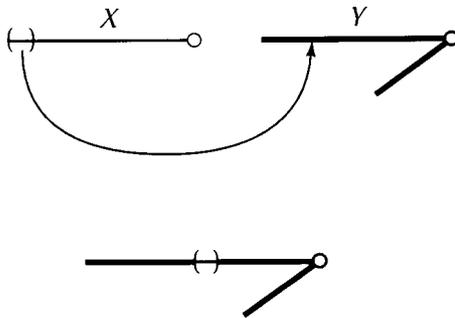
粒反向相连的，3L 原来的外端仍然在最边上。（这与顺序着丝粒居中不同，后者有一个 3 末端与着丝粒相连）



F(2L) 只有第二染色体的游离左臂与着丝粒相连。



y+Y Y 染色体上有一段带有的野生型等位基因的片段的重复，记作 Tp(1;y)y+:



注意：Y 大写是指染色体，y 小写是指基因位点。

§1.4 什么使果蝇如此伟大？平衡染色体

平衡染色体的存在使果蝇与其它生物在遗传学上有所不同。大多数隐性突变在杂合状态下是看不出来的。果蝇通过杂交显性基因型能可靠地从其后代中分辨出来，这给果蝇遗传学比其它双倍体生物的操作更容易和有效。

H.J.Muller 最早提出了平衡子这一概念，他还完成了许多果蝇遗传学的核心工作，他首先发现了平衡染色体能抑制染色体交换，并且用它来分离了新的染色体上的致死基因。从此，多重倒置染色体几乎不与其同源染色体发生交换这一原理就确定了。当这些平衡染色体还携带一些突变标识时，它们在分离分析和定向合成基因型的工作中成为有力的工具。由于这些标记常常是**隐性致死**的，这就提供了构建“平衡致死”品系的有效手段，在平衡致死品系中**只有平衡子或致死突变的杂合体才能成活**。

第二和第三染色体上都有许多平衡子。由于第四染色体不发生交换故不需要平衡子。最有效的平衡子是能够抑制整条染色体发生交换。不能作到这一点的那些一般有很大一部分的正常序列，所以能偶尔与其同源染色体在随后的配对中发生联会和双交换。这将导致平衡子瓦解一部分被正常序列所替代，一些标记交换到了同源染色体上。显然这种情况应该避免，因为它使平衡子的使用混乱化。

由于 X 染色体在雄性果蝇中为半合子状态，大部分 X 的平衡子不携带隐性致死基因。相反，有些 X 染色体平衡子带有隐性雌性不育突变，以防止品系被“置换”。

平衡子通常以字母代表染色体（F 代表 X 染色体，S 代表第二染色体，T 代表第三染色体）M 代表多重倒置，还用数字和小写字母表示系列号。有时，在起名字后面跟着平衡子所携带的主要突变标记的遗传符号。如下面列出的大部分平衡子，每条染色体都有不只一种平衡子：

X 染色体

- FM7a (In(1FM7), y^{31d} , sc^8), 带有显性突变 Bar (B), 隐性突变 yellow(y^{31d}), scute (sc^8), white-apriccot (w^a), vermilion (v^{Of})
- FM7b, 带有 y^{31d} , sc^8 , w^a 和隐性雌性不育基因 lozenge (lz^{sp})
- FM7c, 带有 y^{31d} , sc^8 , w^a 和隐性雌性不育基因 $singed(sn^{x2})$, vermilion (v^{of}), garnet (g^4)

第二染色体

- SM6 (real name In(2LR)SM6, al^2 Cy dp lv^1 cn^2 sp^2), 带有显性标记 Curly 和各种隐形标记 dumpy, cinnabar, speck.
- In(2LR)O, Cy dp lv^1 cn^2 pr, 带有显性标记 Curly 和隐形标记 dumpy, cinnabar, speck.

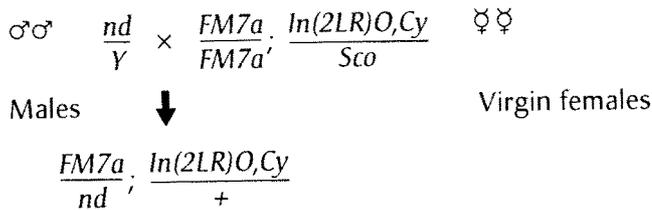
第三染色体

- TM3 (real name In(3LR)TM3, y^+ ri P^P sep bx^{34e} e), 其带有野生型基因 yellow 和隐形标记 radius incompletus, pink peach, sepia, bithorax, ebony, 显性标记 stubble, ser, 也叫 beaded-serrate
- TM6 (In(3LR)TM6, Hn^P ss^{p88} bx^{34e} Ubx^{p15} e) 其带有显性标记 Henna, Ultrabithorax, 隐形标记 spinless, bithorax, ebony
- TM6B (In(3LR)TM6, Hu e) 其带有显性等位基因 Antennapedia(Hu), Dichaete(D3), Tubby, 隐形标记 ebony

- TM8 (In(3LR)TM8, l(3R)DTS th st sb e), 其带有温度敏感显性致死 (l(3R)DTS), 其带有显性标记 stubble, 隐形标记 thread, scarlet, ebony。TM9 是它的派生物。
- T(2;3)CyO; TM9 它是第二和第三染色体的双平衡子, 是由射线诱导的在 In(2LR)O, Cy 和 TM9 之间易位的结果。由于 In(2LR)O, Cy 部分和 TM9 部分是紧密连锁的, 为了得到整倍体它们都必须存在与同一个合子中。

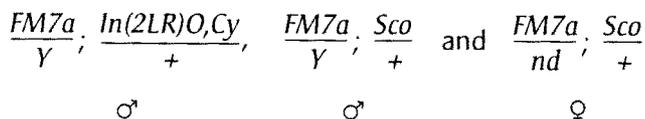
§1.5 解密交配方案

命名后, 下一步果蝇遗传学中最困难的就是交配方案。交配方案是收集所需的基因型和进行杂交的简写。容易使人产生迷惑的一个方面是它不写出所有果蝇后代的基因型, 只写出所需要的基因型。如果方案设计正确, 象基因型一样, 果蝇也表现出独特的表现型。未写出的假设是同源染色体相互配对并在第一次减数分裂中彼此分离, 在精子和卵子中染色单体是随机的, 受精卵中可能的二倍体染色体组合也是随机的。它们是否能存活是另外的问题。我们假设最初它们是都产生了的。简图表示了交配中所涉及的同源染色体的基因型。下面是一个简单而典型的例子:



此图表示雄性果蝇 (因为其有一条 X 和一条染色体 Y, 多只雄性果蝇用 ♂♂ 符号表示) 与 纯合 FM7a 和双杂合 In(2LR)O,Cy 带有显性标记 Scutoid 的雌性 (处女蝇, 多只用 ♀♀ 表示) 果蝇杂交。由于雄性果蝇基因型中未提及第二、三染色体, 它们被假设完全没有遗传突变的野生型(+). (在论文的方法部分, 这些平衡子将使用其正式名称 In(1)FM7a 和 In(2LR)O,Cy。而在实验室中可用简写形式, 本书的大部分例子也采用简写。前面已经提到, 一些 FM7 带有隐性雌性不育突变, 这里 FM7a 则不帶此突变, 本例可以使用。)

这个杂交将产生许多不同的后代。这里只显示了其中一种: X 染色体 FM7a 和 nd 杂合第二染色体杂合的 In(2LR)O,Cy 雌蝇。同时, 在培养瓶中你也回发现其它种果蝇:



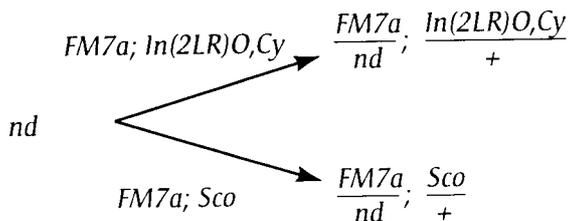
每一种在表型和基因型上是唯一的。FM7a 上的显性突变 **Bar eye** 使得带有 FM7a 的子代果蝇可以清楚地辨认出来。同样第二染色体 **In(2LR)O,Cy** 上的互不影响的显形突变 **Curly** 和 **Scutoid**（使胸后部的刚毛消失），使得带有这些突变的果蝇很容易分辨出来。nd 突变无法肉眼分辨，在雌性杂合体中不影响表型。（**Bar** 是 X 染色体很好的显性标记，因为无论在纯合还是杂合状态都能成活，并且二者能够区分开；雌蝇 B/B 比 B/+ 的棒眼更严重。雄蝇中，X 染色体没有纯合子，只有半合子[雄蝇 B/Y 的棒眼程度与雌蝇 B/B 一样严重]，**Bar** 的生存能力有助于带有 FM7a 的雄蝇成活。相反，常染色体的平衡子带的显性标记突变不需要在半合子状态下能成活，因为第二、三染色体的半合子是致死的。）

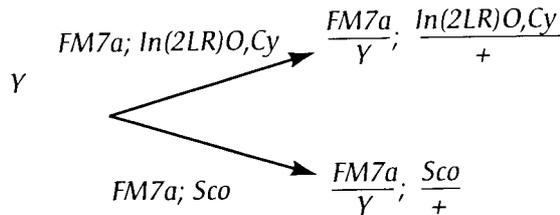
本方案中未写出的假设是减数分裂使同源染色体分离，其任何一个子代个体都只能获得其中之一。（孟得尔的分离律）。每一对同源染色体的分离是与其它染色体不相干的。杂交中亲代雄蝇是性染色体的半合子 **nd/Y**，因而会表现出突变的性状。由于 X 和 Y 染色体在减数分裂中配对并分开，使配子产生两种基因型：**nd** 和 **Y**。亲代雌蝇尽管有两条平衡子和标记突变，但只有第二染色体是杂合体，因此只能产生两种可能的配子：**FM7a;In(2LR)O,Cy** 或 **FM7a;Sco**。这四种配子基因型能形成四种组合。其它染色体的杂合体将增加配子的可能类型相应地增加子代的类型。如果你怀疑杂交可能产生后代的种类数，你可以画一个“方块”确保你能想到所有的组合可能。

female gametes

		<i>FM7a; In(2LR)O,Cy</i>	<i>FM7a; Sco</i>
male gametes	<i>nd</i>	$\frac{FM7a; In(2LR)O,Cy}{nd} ; \frac{+}{+}$	$\frac{FM7a; Sco}{nd} ; \frac{+}{+}$
	<i>Y</i>	$\frac{FM7a; In(2LR)O,Cy}{Y} ; \frac{+}{+}$	$\frac{FM7a; Sco}{Y} ; \frac{+}{+}$

比“方块”更好的办法是“代数”或分叉法，对多突变基因型更适用。





最重要的一点是确保你要的基因型具有独特的表现型，并能与所有其它后代区分开。这是果蝇遗传学的关键所在。

§1.6 基本果蝇管理

幸运的是，对于大多数搞果蝇的人来说，不需要更多的技巧。需要的是留心，而不是手工技巧，果蝇遗传学最大的优势在于能做各种杂交，并且每一种可能的基因型都可以在子代中准确无误地分辨出来。为了确保这一点，必须保证子代果蝇是通过你所设计的杂交获得的，而不是由外面乱飞的或非处女雌蝇杂交得来的。经常你想要得到的果蝇只占子代总数的一小部分，并且可能不是很健康。这就意味着，开始时要用足够多的果蝇进行杂交，以便你能有足够的子代继续后面的实验。

在室温条件下饲养果蝇最容易。这还能防止培养箱出问题---这也是造成果蝇绝种的主要原因。饲养果蝇最成熟的方法是在 25°C 和 60% 相对湿度的条件下。在这样的温度下果蝇传代快，成活率高。发育时间最短，从卵到成虫约需要 9-10 天。（如果在培养基中加入霉菌抑制剂传代时间约增加两天。）果蝇也可以在 18°C 和 29°C 下保存，相应传代时间延长或缩短，并且成活率低。

对于纯种果蝇的饲养，影响其寿命的唯一因素是其健康。老的培养基饲养出健康的果蝇少，容易长霉菌和螨虫，这些是果蝇的克星。好的经验是每两周换一次培养基，25°C 条件下最多保存 18 天。杂交所产生的子代的培养还有另一个限制：杂交 18 天后将产生第二代果蝇，由于你不知道它们的父母是谁，它们的基因型谁也搞不清。

纯种果蝇可以不经麻醉换培养基。这只是一些手上的技巧：将果蝇磕到老瓶的底部（轻点，以免果蝇被食物粘住），迅速拔掉瓶塞，将一个新瓶子口对口倒置于老瓶上，瓶口对准，将瓶子翻过来，轻磕使老瓶子中的果蝇转到新瓶子中。（轻轻地，不要将旧食物也转到新瓶里）然后快速将新瓶子塞好。最初几周的操作中，可能会有许多果蝇跑掉。为了使跑掉的果蝇在实验室中最少，可以使用一些捕蝇的方法。简单的可以用在一个干净的培养瓶底

部放一些醋，少许去污粉和一个放在瓶子上的漏斗，以防止果蝇落水前跑掉。复杂一点的是商品“bug lightes”象郊区后院用的那种。有时用纱网门，但不利于防火。

由于果蝇只能作为活体饲养保存，最好每一品种都有备份。并且能保证随时可以收集处女蝇。对于瓶养果蝇，可以养两瓶，其传代可以是同步的也可以是相隔半代。给果蝇做标记也是同样重要的，最简单的方法是用一个环行标签将果蝇的全部基因型写在上面。果蝇开始培养的日子也要写在瓶子上，以便你能确定果蝇的日龄。

开始培养多少果蝇依赖于基因型的成活率，并且每种有一个最佳值。这需要经验。一般来说，突变越严重（特别是显性的），成活率越低。染色体重排（如：平衡子，复合染色体）降低果蝇的生育率。瓶中果蝇太少，培养基将被霉和细菌吞噬。培养瓶中太多果蝇，培养基中由于积累过多“废物”而变得很稀，以致从瓶中向外到果蝇时，培养基也跟着掉出来，搞得那都脏兮兮的。过稀的食物还造成果蝇的翅膀粘到身体上，使分辨翅膀表型或其它遗传标记时产生困难。如发现食物变得越来越稀，你可以在食物中加入一小片纸巾。为了防止纸生霉，事先应对其做防霉处理。野生型和那些单突变的果蝇一小瓶需要 10-15 只雌蝇，大瓶要 25-35 只雌蝇，而小管只需 4-8 只。雄蝇的需要量比雌蝇少，因为它可以与多只雌蝇交配。有多重标记，显性突变和重排染色体的果蝇需要比上述多 1 到 2 倍的量。如果不知道需要多少果蝇开始，最好的办法就是在果蝇发育中经常观察。当食物开始松动（特别是靠近表面处）时，就表明有足够多幼虫，可以到掉亲代的果蝇了。这大约需要四天，依不同基因型而定。做杂交时，及时在子代羽化前将老蝇到掉是很重要的，这样就不会将子代和亲代搞混了。这也是在瓶子上写上开始日期的另一个好处。

§1.7 精心于难养品系

这个题目是指培养那些生存力弱的果蝇，挽救那些所剩数目极少的品种，或者完成一对果蝇的交配。所采用的基本方针是：在新鲜的事物瓶中加入新鲜的酵母，在理想条件下（25°C，60%相对湿度）饲养，并不时的祈祷。

如果你要在瓶中从雌雄果蝇开始饲养，当你发现有新的后代羽化出来，最好把它们转入新瓶中。如果羽化的果蝇继续留在原瓶中，将活不长久。这样你就开始了新的饲养。如果你有足够的果蝇更快地传下一代，你可以将亲代果蝇半途移到另一个新鲜的培养瓶中，这样你最终得到的子代果蝇数会大增。

§1.8 为杂交收集果蝇

为了能清楚的完成杂交，你必须从处女蝇开始。在 25°C 条件下，**新羽化 8 小时内雌性果蝇不会与雄蝇交配**。这就意味着，通过在早晨和 7-8 小时后分别收集两次可以很容易获得处女果蝇。早晨是大多数蛹羽化成成虫的时候（培养箱按昼夜规律照明），这是它们最为著名的昼夜规律。尽管你可能不认为早晨的雌蝇都是处女蝇，但它们大多数是，这可以从它们苍白的体色，及透明腹部的黑点看出来。（黑点为果蝇的标记，是肠道中的残留物）如果你很精心地每个早晨都清光瓶中的成虫（包括那些粘到瓶壁和食物上的果蝇），则任何 7-8 小时内羽化的雌蝇都是处女，尽管它们看不出是新生的样子。

在早晨能收集更多处女蝇的较有效的方法是在头一天收集完后，将果蝇在 18°C 过夜。在这样温度条件发育显著减慢，新羽化的雌蝇 16 小时内 98% 不会交配。如果你上次瓶子的果蝇已经清理干净，在早晨收集的果蝇可以看作都是处女蝇。为此，**你只需将饲养的温度调为白天 25°C，夜晚 18°C 即可**。如果非处女蝇的后代容易分辨的话，2% 的误差不会有问题，否则还是保守点好。

对于很多杂交，为了控制非处女蝇的出现，可以使用“处女标记”——雌蝇带有的纯合隐性突变标记，在杂交后变为杂合体。如果子代带有这一标记，它们就不是处女蝇的后代，可以扔掉。当你正处于杂交方案的半道上，你不是用纯合品系果蝇进行交配，你仍能通过预期子代果蝇的基因型和由于非处女蝇杂交产生的标记组合来加以区分。若你的杂交方案安排的很好，可以做到上面这些，你就可以高枕无忧了。

杂交所需的雄蝇可以随时收集，值得考虑的是它们在 **3 天或老一点时**与处女蝇交配最有效，太老（大于 10 到 15 天）的雄蝇没有交配能力了。这是由于雄蝇羽化后需要一个成熟过程才能与雌蝇交配。在这个意义上，雌蝇、在羽化后比雄蝇更成熟。

尽管性别比例为 1:1，但每天收集的果蝇并不一定如此。雌蝇比雄蝇发育快，故在最初出生的新蝇中雌蝇要比晚些时候的比例高。

方便的方法是将你杂交前收集的果蝇在杂交时一起用上，因为可能要几天才能收集到足够的果蝇，或因为食物未作好，或因为你愿意在周五开始你的杂交工作。（周五开始杂交有一个好处就是子代将在 10 天后也就是下周一羽化。然后你又在随后的五天收集子代，在周五继续开始杂交，这样你就可以享受周末了，千万别告诉你老板。）新鲜的果蝇瓶是保存果蝇的好地方，每瓶 20-30 只。如果果蝇在瓶中呆了好几天了，就应该转到新瓶中以保持果蝇健康。在不拥挤的新鲜瓶中果蝇可以活 40-60 天，可是它们的生育率将逐渐降为零。

在保存期，若没有幼虫在食物中蠕动，就可以保证你的果蝇是处女蝇。在保存期末了，你还可以将雌雄果蝇混在一起饲养一天，这时你在用新瓶进行正式杂交时，雌蝇此时已经交配过了。象许多次级反应一样，在瓶中拥挤的情况下，雌雄果蝇相遇的几率高，杂交速度快。

现在，大部分人用CO₂来麻醉果蝇以便收集处女蝇和进行标记检查。各种器械被设计用来释放CO₂于一个平坦平台，在操作时使CO₂保持在低水平。通常先用软管插入培养瓶中麻醉果蝇，或是直接到在麻醉器上-- 一个使果蝇接触的可渗透容器。

传统麻醉果蝇的方法是用乙醚。乙醚麻醉仪是一个封闭的容器，一块棉花放其底部浇上乙醚并用一个透气的管子装果蝇。注意不要过度麻醉果蝇（用CO₂就不会有这种事）。一旦果蝇麻醉了，就必须在它们苏醒过来之前完成分类工作（夏天热时醒的快）。

这种麻醉方法对行为有不利的影响。CO₂和乙醚都在一定时间内损害神经活动。所以在做行为检验前，应让麻醉的果蝇至少恢复 24 小时。

第二章 分离新的变种

我们利用果蝇作为研究对象并不是因为它们格外聪明，而是因为突变——我们可以获得突变并研究分析这些突变。我们今天的果蝇的分子生物学大厦正是以此为基础的。

大多数的遗传学方法是不适合于定点突变的——突变某一预定好的基因，就如小鼠中的敲除技术一样。实际上它们大多是随机的，然后采用遗传检测的手段来确定特定的突变。而在微生物遗传学中的筛选方法基本上都不适用于果蝇。

许多的单个 F1 果蝇在其全部的性细胞中有一套突变的染色体。由于化学突变剂常作用于 DNA 双螺旋的某一链上，F1 代果蝇将会是嵌合体，因为染色体是采用半保留复制的。也就是说，DNA 的单股序列的改变只会传到下一代果蝇的一半的细胞中（在首次有丝分裂之后）。故新的突变会在下一代果蝇的某些细胞出现，而在另一些细胞中却没有。若这个突变只在组织细胞中表达而不在生殖细胞中表达，这可能会产生一个不可遗传的突变的表型。但 F1 代的性细胞却很少是嵌合的，因此尚需做进一步的杂交实验来揭示某些子代果蝇的突变。当然在另一些果蝇中突变性状会被恢复。

突变体

突变剂的选择取决于你所需要的突变类型和你计划在此花费的时间的长短。化学突变剂最适合于获得单点突变（或者小的基因内缺失），因此它们比较适合获得等位突变序列或者是条件突变（如温度敏感型），以及事先确定表型的突变（如学习突变体）。放射法最适合制造重排，比如易位、重复、缺失和倒置。而插入突变则最适合于突变基因的快速分子克隆。其衍生出的一种技术增强子陷阱则可基于增强表达的模式来鉴定基因。

诱变剂的介绍

EMS

EMS 是最为常用化学的诱变剂，它是一种烷化试剂能导致大量的点突变，尽管也能造成小的缺失和其它重排。其使用剂量取决于所采用的遗传分析方法，比如在寻找新突变时需要采用低剂量，而在已有突变的基础上寻找新的突变则需要较高的剂量。这是因为在前一种情形中染色体必须弄成纯和的，而后者中突变将用另一种染色体来检验。这其中的道理便在于当你弄出纯和的突变染色体以寻找特定表型

时，你不希望其它的纯和突变，尤其是隐性致死突变也同时存在，从而使原定的方案复杂化。

在低剂量条件下雄蝇进食 2.5MM 的 EMS1%蔗糖溶液过夜，结果平均每一条染色体都会发生一个致死突变，或者说突变比率为每个基因位点平均每千条染色体会发生一次突变。（也就是说你在检验某一果蝇的后代时，你就会发现每六个果蝇的染色体上有一个新的致死突变。如果你分析某一位点新突变，那么你将从大约一千条染色体中分离出一条在此位点突变的染色体。这和每条主要染色体臂上约有 1000 个致死基因是一致的。）而当突变染色体必须在杂和条件下分析时，则剂量应该加倍。（比如通过缺失分析新的突变时）*假设每条臂有 1000 个致死基因，而且只有一个发生致死突变。*

突变处理后的果蝇与雌蝇交配 4-5 天，然后雄蝇移走。这么做是为了增加特定突变染色体的比例，因为诱变剂也能影响干细胞。当此细胞受影响时，会产生同样突变的多个精子。由于干细胞的敏感性较差，其染色体的突变率较低。因此突变处理后的雄蝇必须在这些干细胞转化为成熟精子细胞前抛弃，由此保证各突变是独立被诱导的。独立诱导突变的好处在于你不必浪费时间把同一突变分析多次。而且在试图达到突变饱和时，唯一的检验饱和与否的方法是独立突变的重复频率。*一个生殖干细胞分解成四个精子，如在干细胞水平发生突变则四个精子都带有突变，会大大增加筛选的难度，因此我们要保证各个突变是独立被诱导的。*

EMA 作用于 DNA 双螺旋的一股。这意味着 F1 后代将是嵌和型的，至少在某种程度上是。但这只是在检查 F1 代表型时起作用，因为新的突变在生殖细胞和体细胞都必定存在，体细胞的突变表型是必定可以检测到的，即使不是所有的细胞都发生突变。

待处理的雄蝇最好是 3-5 天的，最容易交配。但是必须注意的是许多果蝇会在处理中死亡，存活也并非全都可育，许多的 F1 后代也是不育的。故而完全有必要预处理大量的雄蝇——大约是你需要的 F1 后代数的一半。同理通过预实验来估计果蝇的突变剂敏感性也是个明智的办法。预实验的一个好处是估计你的杂交方案能否获得你想要的后代果蝇。当然，很多主意有时看起来很不错，但在实际操作中却常归于失败。

ENU

我们假设象 EMS 这样的试剂在染色体上的作用位点是完全随机的，但事实并非如此，这在另一种诱变剂所诱导的突变中尤其如此。在使用 ENU 时，尽管总的突变率与 EMS 相当，但是在基因的突变率和所获得的突变方面却不太一样，F1 子代中重排的频率和出现嵌和体的几率都有所下降。在其它方面，ENU 和 EMS 的突

变原理和操作方法都差不多，7.5MM 的 ENU 可在 40%的染色体上造成致死突变。

ENU 比 EMS 对哺乳生物的毒性更大，可高频的诱发小鼠的脑肿瘤。许多的果蝇工作者出于安全考虑都不用 ENU。

放射法

X-射线是最早的诱变方法，至今仍是许多科学家的重要手段，获得放射源的最简单途径是 X-光机和钴或铯源。它们都能导致染色体断裂，有时又随即修复，可以获得易位、缺失、转座和倒置等各种重排染色体。若是染色体断点正好落在某基因的区域或是在特异的区间合在一处，就有可能导致突变型的出现，此即所谓的“倒置现象”。有时放射性也可导致点突变。

成熟的精子细胞对放射诱变最合适，但由于其中只有一套染色体，故其重排范围有限，如同源染色体之间的重排事件就不会发生。放射性处理的诱变频率比化学诱变剂低的多，4000r 的放射量在每条染色体臂只能造成 5%的致死突变。而标准计量 EMS 则为 60%，而这已经是造成过度不育前提下的最高剂量。由于断裂是 DNA 两股同时进行，后代果蝇中不会有嵌和体现象。否则，可依照化学诱变的方法进行处理。

插入突变法

通过转座子的插入来打断基因的方法并不是最容易的方法，但是其标记基因或者是“增强子陷阱”的优点足以抵销其不便之处。其基本原理是将可移动基因片段转移并插入染色体的新位点中，又称为杂交不育。P-因子是最常用的转座子，最近又发现了 Hobo 因子。P-因子突变可利用完整的转座子进行，如含有许多 P-因子的果蝇品系，也可以利用缺陷转座子，它可以被转座但自己不能单独完成。这些缺陷转座子必须在引入别的转座酶来源，通常是整合有转座酶的基因后，才能发生转座。

缺陷转座子的好处是转座事件可以只通过引入或移走转座酶来控制。实际操作中则是通过引入或移走含转座酶的染色体。当把转座子和转座酶置入同一只果蝇的细胞时，其发生转座插入的果蝇就可能产生突变后代。打个比方，杂交中带有转座子的果蝇经转座酶的处理，发生突变，就象是染色体受到化学诱变剂的处理一样。在这种方式中，分离突变体过程同样没有嵌和体出现，只须将转座酶移走即可。

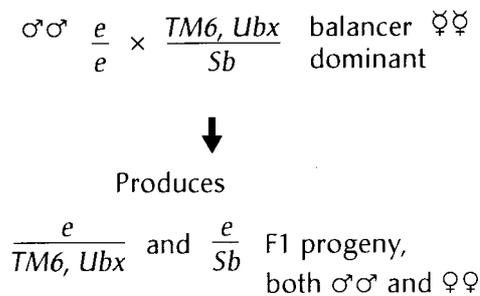
转座发生的频率是切割频率和插入频率的组合。前者和转座子的大小和碱基序列有关，后者则完全取决于插入位点的序列。某些位点如 Sn 的插入频率高达 1%，另一些如 Adh 则基本上没有插入，平均起来位点插入几率为 1/2000。改变这种插

入不平衡现象的一个好办法就是寻找更多的类型的转座子。

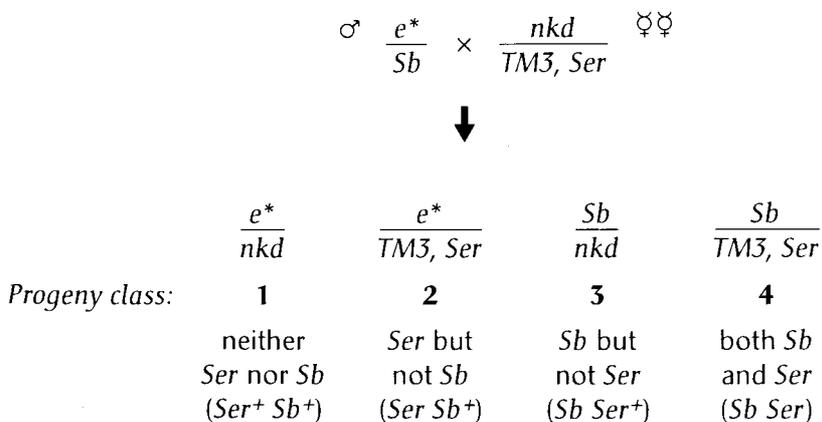
常染色体上新的等位基因的检出

通常深入研究某一基因的行为可以用分析等位基因序列来进行，基因所参与的过程越是复杂，这中分析方法就显得越重要。其基本方略就是经典“**互补检验**”，新突变的染色体与该位点的已知等位基因进行杂合。这种方法的关键在于发生新突变时能和原来的等位基因型的表型区分开来。下面是一个简单的例子，是关于分离第三染色体上的新的隐性突变：

突变野生型雄蝇，与带有杂合显性标记 *Sb* 和 *Ubx* 标记的 *TM6* 平衡染色体的处女蝇杂交。但事实上，人们很少用野生型的雄蝇，而实际采用某些有纯和标志基因的雄蝇，如 *e/e*。



F1 后代中一个是 *Ubx* 而无 *Sb* (即 *Sb*⁺)，另一种为 *Sb* 而无 *Ubx* (即 *ubx*⁺)，挑出 *Sb*、*ubx*⁺ 的雄蝇，它们单只与有 *nkd* 和 *TM3*，*ser* 杂合的处女蝇杂交。在 F1 后代的基因型为：



在此草图中，各同源染色体均已列出。他基本上反映突变染色体的扩增过程。第一次杂交是群体进行的，因为在一个突变雄蝇中，其精子的基因型是特异的。其 F1 代现在各有一单套突变染色体，故通过与处女蝇一对多式的交配可以检出所想要的突变。（开始时雄蝇的数量取决于你想在 F1 代中挑出的用于杂交的雄蝇数量，大体上首次处理的雄蝇数目应是想在 F1 代获得雄蝇的两倍。而在 F1 代所要的雄蝇数目则取决于你愿意投入的时间和精力）。“野生”雄蝇一般带有些标记基因（如 e），这有助于在后面纯和存活的检验杂交中认出突变染色体。

这一方案也显示了明确判定基因型的基本原理，每一种后代可以通过显性标记的有无很容易判断出来。class1 中没有任何显性标记，如果没有 class1 型子代出现，那么你可能诱导了一个新的突变，它不能弥补 nkd 的致死性。但这种情况很少见，故一般情况下 25% 的此代果蝇是没有显性突变的。这类果蝇中也可以分现 nkd 新的等位突变，如果能设法辨别出来的话。它们跟原来的 nkd 等位基因在表型上可以相同也可不同。

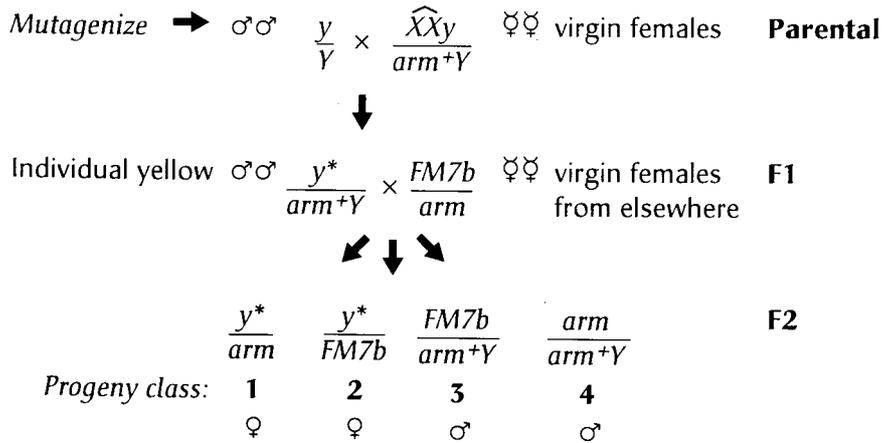
如果在此过程中有那么一两瓶果蝇有新突变，这个方法可以说是鉴别突变染色体的好方法，而且最初的那只雄蝇不必存活。新的突变也可以在 class2 中检出，它们有从基因亲处继承而来的 TM3、ser，此方案中很重要的一点是在第二次杂交中用了两个不同的显性突变，它们基本上是染色体的商标。也就是说，在 F1 代有 sb 的果蝇就携带突变染色体 e*，类似的是第二次杂交时的雄蝇，有 ser 就表示带有 nkd。由于这些显性标记在下一代与其同源染色体分离，故 F2 后代中有 ser 的必有 e*（无 sb），有 sb 的必有 nkd。这是鉴定基因型最有用的方法之一，特别是你所要研究的突变是隐性时。但如前所说这种方法的成功有赖于雄蝇中重组现象的绝迹和雌蝇中重组为平衡染色体所抑制。

关于这个方案要说的最后一点是你可以为新的致死突变建立平衡体系。收集 class2 中的处女蝇和雄蝇，你可以得到一个品系，其存活后代的基因型与亲代一样，任何纯和体都不能存活。

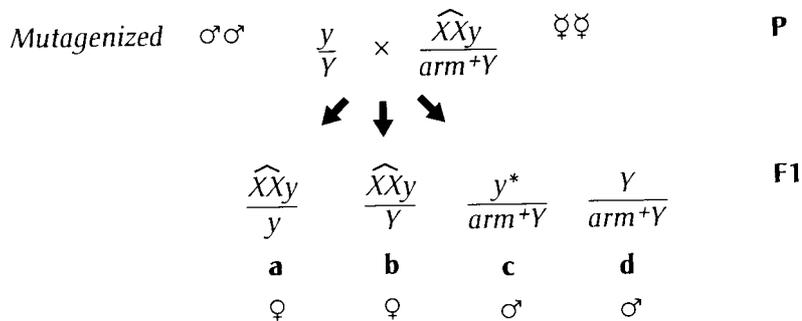
§2.3.2 X 染色体上新的等位基因的检出

在常染色体上获取定点突变是很直接的，但若是雄蝇在 X 染色体发生致死突变则会麻烦的多。这是因为雄蝇只有一条 X 染色体，隐性突变基因可以充分表达。X 染色体上若有致死突变，将在传代过程中会遇到很多麻烦。

检验新的突变一定要有“互补”。必须使继承此突变的雄蝇能存活，最简单的解决办法莫过于采用正常区段的重复以实现变相杂合，这可以是在 Y 染色体上重复 X 染色体上的某一正常区间，也可以在常染色体上进行重复。下面便是有代表性的一例，要分离的是 armadillo，其初始野生型有 y 突变。



这一方案显示了一些X染色体所特有的特征。我们注意看亲代的杂交， $\widehat{X}X/arm^+Y$ 有y标记的连体X和Y染色体，后者有正常armadillo基因，（记住这条Y即不能该改变性别也不能改变生育能力）。这种情况下，Y将与 $\widehat{X}X$ 在减数分裂时分离，故其后代要么有 $\widehat{X}X$ ，要么有 arm^+Y 。当经过携父亲性染色体的精子受精后，产生的后代就是：



但只有b和c种是可存活的，a有三条X而d有两条Y不可活。b继承母亲的 $\widehat{X}X$ 和父亲的Y，而c有正常的染色体组成。如果突变成功，则c果蝇有突变x染色体及一个Y重复，它覆盖了armadillo突变。也就是说若X有新的arm突变，雄蝇中它将为 arm^+Y 所挽回。（若是在此区域以外有突变，则不可挽回而不能存活，当然这也不是你想要的。）

在F2代，class1可以用于检验是否是armadillo的新等位突变： y^+/arm 。这可以育用来判断class2是否有这种新染色体，它已为FM7b所平衡。如果是，则class2处女蝇跟FM7b/y杂交，即可建立所要之品系。（由于FM7b有 l_2^{sp} ，是雌性纯和不育的，故其后代中只有一种交配类型，即 $y^*/FM7b$ 和 $y/FM7b$ 。）

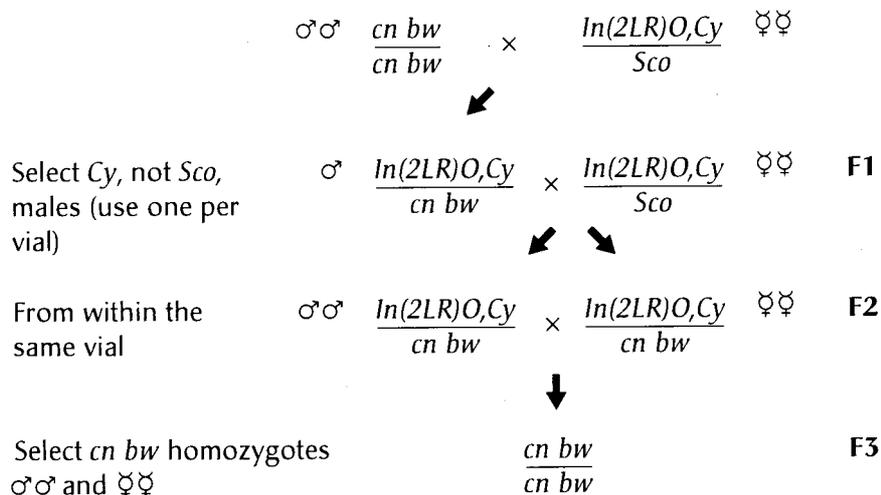
§2.3.3 通过突变鉴定新基因

我们现今关于果蝇受精卵发育过程模式的遗传控制图谱的知识，绝大多数来自 Wieschaus 和 Nusslein-Volhard 在 70 年代所分离出来的一系列突变体。他们所采用的是经典的利用突变分析来发现影响表型的新基因的方法。他们只采用了一个假设，即影响成熟受精卵壳甲发育模式的基因在果蝇中是存在的。这个方法还有个好处是它没有什么偏好——任何参与此过程的分子都有机会被发现——而事实上这一点已经被转录因子，受体酪氨酸激酶和紧密连接分子的发现而被证实。这种方法是为了发现任何影响壳甲表型的位点而设计的，要达到这一点他们要获得许多突变染色体纯和的品系，而且要有简捷的方法将模式的改变辨认出来。而下面则是更为基本且适用的一种方法。

§2.3.3.1 单一化初始品系

这里我们以要得到的纯和致死突变为例，这首先就需要保证这起始品系本身没有携带致死突变。乍看起来，这一步显得多余，因为果蝇既然是活的，似乎就不该有致死突变。可是事实是残酷的，尽管随机突变率通常低得可以忽略不计，但并不等于零。它们随时可以发生，在小的群体中，如一个培养瓶中，这些突变甚至可以在群落中起主导地位。有些是隐性致死的，一些活的果蝇也可以在杂合状态下携带此突变。只要有 1% 那么一丁点的果蝇是携带者，而此果蝇又是作为初始品系的化，则你要分离得到的突变极有可能是已经存在了。当然，对于调皮的本科生或是某些以实验来消遣假期的人来讲这个方法还不赖，对于你真正的研究者，这可不是一个好主意。

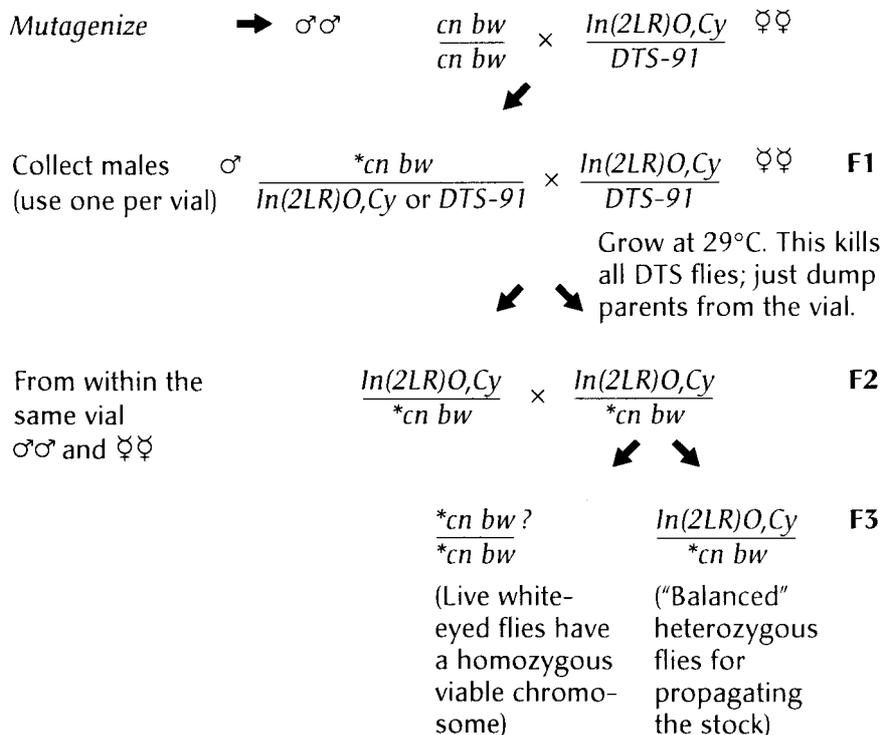
怎么办呢？可以单一化初始品系。也就是说，从单一一条染色体获得一个新品系，然后在发生随机突变之前马上用于突变实验。下面是个单一化第二染色体的草图。（此染色体携有眼色标记 *cinnabar* 和 *brown*，共存时形成白眼，这有利于鉴定致死突变。）



在 F1 这一步，单条的 *cnbw* 染色体被扩增。在 F2 代中都有了同一条 *cnbw*，它是不能和其同源的 *In(2LR)O,Cy* 染色体重组的。到了 F3 代，就得到单一第二染色体的品系。在 F1 阶段准备多分是个好方法，因为若你只做了一个杂交而恰好 *cnbw* 染色体有个致死突变，那你就一无所获。事实上因为是单只雄蝇杂交，你完全可以根据最后的结果判断出有一个致死突变存在。在保证 *cnbw* 染色体能最终存活的同时，你还应该注意观察它们是否足够“健康”。正常情况下，*cnbw: In(2LR)O,Cy* 的比例是 1: 2。

§2.3.3.2 突变筛选

现在我们还回到突变上来，上述的这点麻烦事仅会用去 8 周时间，而在此时间内，你完全可以将实验中要用到的果蝇偶像扩增到足够的数目以用于大规模的实验分析。而且，你还可以在这段时间内看你要用的品系是否出了问题。大体分析方法如下：



从原理上讲，这个方案跟单一化 *cnbw* 染色体的方法很类似。诱变 *cnbw* 需要使之与带平衡染色体的雌蝇杂交，得到单独的与显性标记染色体配对的突变染色体，再将这种雄蝇与有带同样的平衡子和显性标记染色体雌蝇杂交，于是这个突变染色体就可以变成纯和态的了。

这个方案较有特点的是使用了 DTS。此突变携带者在 29 度以上培养时会死亡。它在发育时起作用，一般是在产卵后将培养瓶移至高温处。使用 DTS 的好处是 F2 代不必费力的去挑选处女蝇了，想想吧，通常得挑上一万瓶！DTS 的杀伤作用只有 **cnbw/In(2LR)O,Cy* 可以幸免，只须倾掉亲代果蝇，让子代果蝇自行交配即可使 **cnbw* 纯和。唯一的要求是 F1 代需要挑出大量的处女蝇。但这里也必须注意，如要寻找的突变是温度敏感的就不能使用 DTS 了。

当 F3 代出世时，你只须看看瓶子里有无白眼就可以了。有则无致死突变即可以扔，如果没有，则你已经得到了新的已平衡好的致死突变了。从另一方面看，如果你要找可活的突变那你就该保留此瓶。

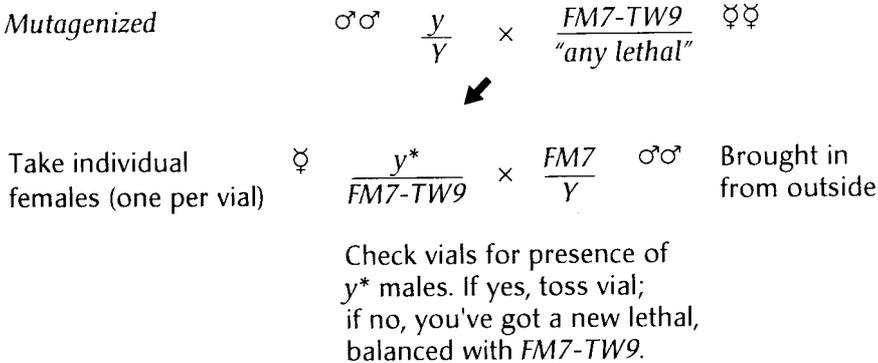
这个方案还有些可能发生问题的地方，但只须稍加注意即可。首先，说“没有白眼即有突变”是基于果蝇的数量很大的条件的。若果蝇不多，则可在下一代进行扩增来进行验证。其次，在子代果蝇出生之前一定要将亲代果蝇除去，才能保证操作与方案一致，最后 DTS 在实验前必须检验，看是否能正常其作用，以免遗漏。

从带标记的染色体开始突变有很多优点。检验出致死突变的方便之处自不待言。这两个标记也有助于日后对突变进行定位作图。（而且它们有助于你不重复分离，你的同事已分离出的突变。）因为果蝇间的污染时有发生，有了标记你就不会误拿同事的果蝇而交叉污染了。这些事看来不太可能，但却必须严肃对待。有时直到最后发现两个突变一样时才发现犯了错误。

当然，除了致死突变，别的可存活但也很有趣的突变也会同时发生，各种新突变都有可能。

§2.3.3.3 筛选 X 染色体上的新基因

在具体到 X 染色体这一特殊情况时，无疑 Wieschaus 和 Nusslein-volhard 设计了一个有效的方案：



这个例子很简单，也很有说服力，首次杂交中处女蝇的基因型为 *FM7-TW9/ any lethal* 是关键。*FM7-TW9* 是 *FM7* 的变种，有隐性致死突变。另一条染色体可以带任何致死突变，以保证此雌蝇可活，而后代中雄蝇不能存活。故其后代就都是处女蝇而不必挑选，将这只雌蝇与 *FM7* 雄蝇交配，若后代有 Y 型雄蝇则无新的致死突变，反之则有。

这一方案同样要求用大量的果蝇以获得足够多的子代来保证确定没有 Y 型雄蝇产生。由于这之中有的一步是单只雌蝇杂交，这一要求显得尤为重要。由于单只雌蝇交配可能不能在一个瓶中形成群落，所以应该多准备几份以备不测，提高成功率。

§2.3.4 插入突变和增强子陷阱

果蝇中P因子转化作用发现不久，，可以插入产生突变并对之进行标记的转座子便迅速扩展到果蝇研究的各个领域。它几乎达到小型的产业化，使用简单的携带有 ry^+ 或 neo^+ 转化载体即可。一种改进的方法，增强子陷阱P因子在插入基因特异表达

的组织部位表达 β 半乳糖苷酶的方法，P因子插入的应用更广泛。现在全世界几乎没有一家果蝇实验室没有自己的增强子陷阱品系。

插入突变最早是由于它利于克隆被打断的基因而颇受青睐的。而质粒挽回序列的引入则使它变得更容易了。这足够弥补它在突变率低上的不足。换句话说，这种技术就是一种诱变手段。而借助基因表达模式分析突变的增强子陷阱技术则是鉴定基因的一种全新的方法。新的插入品系能大批生产而且易于分析，因为 lacZ 的位点依赖的表达不需要插入是纯和态的，那些你所想要的表达模式的果蝇品系你就可以保留下来，使插入突变纯和，看看有没有明显的表型变化。

使 P 因子转座进而鉴定新的插入品系的杂交方案跟前述的标准突变分析方案没什么大的不同，只是诱变手段从物理或化学的方法变成了导入转座酶而已。两个因素是必须的：**被转座的转座子和使转座的转座酶。**

§2.3.4.1 增强子陷阱分析

增强子陷阱技术中的转座子含P因子的端序列（剪切识别用的），它可被转座酶作用，中间是lacZ，野生型的眼色基因和质粒挽回序列（多为抗氨卞青霉素基因和复制起始位点，通过培养可使之分离）。载体上常用的是“小基因”（只取基因中的关键部分），其表达受插入位点的影响，不仅可用于分辨不同眼色的品系，而且能区分纯和体和杂合体*有剂量效果*。为了实验方便，转座子更是组合到了平衡染色体上，如In(2LR), Cy,和P(ArB)A4.1M2，一个携 lacZ,ry⁺增强子陷阱的In(2LR), Cy 变体。在此情形下，所有未发生转座的携转座子的染色体可以容易的由Cy⁺后代选出。而转座酶则来自于稳定整合于第三染色体上的缺陷P因子，它靠近右末端，P [ry⁺ Δ 2-3] 表示 **它缺失ORF2 和ORF3 两个开放阅读框间的内含子**。通常它常和显性突变Sb整合在同一条染色体上以便于跟踪它。

这种技术的关键是P [ry⁺ Δ 2-3] 和转座子同处一个性细胞时能否发生转座。通过杂交，可以把这二者置于同一雄蝇的不同染色体上，而且可以使转座只在此一代中发生，以免再转座而把事情弄糟。这只需把P [ry⁺ Δ 2-3] 移走即可。由于跟Sb在用一染色体上，P [ry⁺ Δ 2-3] 很好辨认，但它必须用平衡子平衡以保证它们不发生交换而分离，或者是在雄蝇中。转座子的去向可以眼色标记来跟踪，多转座发生时，只需挑出眼色标记没有正常且没有Cy的果蝇。（当然这是染色体间转座的情况）。前提是必须在眼色缺陷的基础上进行。

下面是一个典型的“jump-starter”方案的例子：

$$\sigma\sigma \frac{\text{In}(2\text{LR})\text{O,Cy, P}[\text{lacZ, ry}^+]; \text{ry}^{506}}{+; \text{ry}^{506}} \times \frac{\text{Sb P}[\text{ry}^+\Delta 2-3]}{\text{TM6, Ubx}} \quad \text{♀♀ P}$$

These males are Cy.

These virgins are Sb and Ubx.



$$\text{Select } \sigma\sigma \frac{\text{In}(2\text{LR})\text{O,Cy, P}[\text{lacZ, ry}^+]; \text{Sb P}[\text{ry}^+\Delta 2-3]}{\text{Cy Sb Ubx}^+; \text{ry}^{506}} \times \frac{\text{ry}^{506}}{\text{ry}^{506}} \quad \text{♀♀ F1}$$

males, which are dysgenic, and mate to ry virgins.



$$\text{Select single } \text{ry}^+ \text{ Cy}^+ \text{ Sb}^+ \text{ males or females; they will have possible insertions (*).} \quad \frac{+^*; +^*; \text{ry}^{506*}}{\text{Y}; +; \text{ry}^{506}} \text{ or } \frac{+^*; +^*; \text{ry}^{506*}}{+; +; \text{ry}^{506}} \quad \text{F2}$$

♂       ♀

在此方案中，起始雄蝇为第二染色体杂合，而第三染色体纯和。它们和第三染色体上Sb P [ry⁺Δ2-3] 杂合的携带转座酶的处女蝇交配。这是为了获得同时有In(2LR)O,Cy, P [lacZ, ry⁺] 染色体和Sb P [ry⁺Δ2-3] 染色体的F1雄蝇，这些雄蝇中是杂交不育的且P因子转座到一个新的地方去，为了检测出转座事件的发生，F1雄蝇与纯和的ry⁵⁰⁶ 处女蝇杂交。注意必须保证ry⁵⁰⁶ 是纯和的，这样才能利用ry⁺-P因子来检验转座子的去向。

在F2代果蝇中就可挑出有新的P因子插入的果蝇，此时它们不在含有转座酶，否则这已获得的转座就不稳定了，可以再被转座走。这些果蝇可以根据是否不含Sb(故无P [ry⁺Δ2-3])和不含Cy(可以除去带有ry⁺p因子的染色体)。这后一种情况就可以确定新的染色体的ry⁺是ry⁺活性的唯一来源，也就肯定是新的转座。而这也说明保持第三染色体ry纯和是至关重要的。+*表示X和第二染色体，ry⁵⁰⁶*表示从F1不育雄蝇中继承来的第三染色体，这些染色体都有可能带有新的P因子插入。

任何新的插入都可以继续挑选ry⁺后代并与ry⁵⁰⁶纯和处女蝇杂交来繁殖。对于你想要保存或想检测其纯和存活力的品系，确定其染色体定位及平衡是很重要的。故此可以造出有FM7或In(2LR)O,Cy的纯和ry⁵⁰⁶或是带第三平衡染色体的TM3, ry^{Rk}Sb e 和TM2, ryUbx,这是很有用的。你然后通过第三章中的方案确定插入所在的染色体，并且用平衡染色体来平衡。

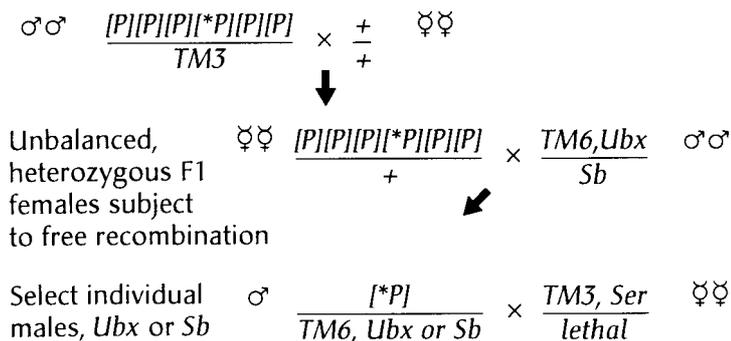
§2.3.4.2 已知位点的新的等位基因

如果你的目的是要在已知的突变处获得新的插入等位突变，那么杂交方案就需要做些改动，为的是增大每个生殖细胞中发生转座的机会进而对可能的新的插入做补偿测试。由于在大多数位点发生插入的频率较低，这就要求初始转座子的数量越多

越好。为此，人们造出了一种叫Birm2的含17个P因子的第二染色体，它们可被转座但缺少转座酶活性。但此法有一个缺点是后期要花很多的时间从众多的P因子插入中找出你所需要的。另一种染色体可从Bloomington种藏中心获得，够减少这种麻烦。有8个P[w⁺]插入在连体X(XX)上。这些P因子挽回序列和w⁺标记，可节省大量时间，但转座子数量和转座频率却又比Birm2低。

第一次杂交跟增强子陷阱一样，在F1雄性的生殖细胞中将Birm2染色体和Sb P[ry⁺Δ2-3]染色体组合在一起。打这以后，方法就跟化学突变一样了：将某一染色体扩增，然后进行补偿测试。唯一的变化就是在下一代中将Sb P[ry⁺Δ2-3]去除以防止转座子再转座。由于目标是某一确定的位点，而且转座子不带野生型的眼色标志，没有必要对这些转座子进行遗传上的跟踪。

在这方案的最后一节中，必须清理含新插入的突变，因为几乎肯定会有一个以上的插入，故应除去在其它染色体上的P因子。多个插入会使对某一特定位置的扩增变得棘手。清理可以通过让特定的那条染色体进行自由重组来进行这样可将不需要的插入经重组而去除。此后再分离那条带突变的染色体即可。



这几步的原理就是要得到携带P因子插入染色体和野生染色体的杂合雌性。在这些雌蝇中自由重组将产生特定的重组染色体，而且可以在F1雄蝇中用TM6平衡或和Sb杂合并检出。F1雄蝇然后与携带有已平衡的致死突变的处女蝇交配来确定哪一个是新的致死突变的插入。由于不是所有的重组染色体有此致死突变，故至少要建立20个品系。通常一轮的重组还不足以将所有的插入清除，特别是当它们离目的插入很近时。出于扩增的考虑，只要额外插入很少而又不是很靠近目的插入而对它产生影响，就没有将它们清除干净的必要。由于Birm2 P因子没有任何用于质粒挽回的序列，每个新插入都应该得到扩增并建立成文库。最后插入的重新转座，如果有遗传标记就更容易进行。故对要证实某一突变确实由某一插入引起而做重转座时，用P[w⁺]的好处就很明显了。

§2.3.5 突变没有等位差异的基因

许多的基因是通过分子或生化的方法来确定的而非突变，它们最初并没有突变体。多数的此类基因的染色体作图是经过多线染色体的原位杂交进行的。通常，你可能想获得此类基因的突变，但又苦于没有简单的突变检出手段。与酵母和小鼠不同，在果蝇中通过同源重组得到的基因替代修补效果不好。虽然已经有一些这方面的尝试，但一个先决条件是必须在此基因附近有两个 p 因子，对于这一困难，也有不少办法。

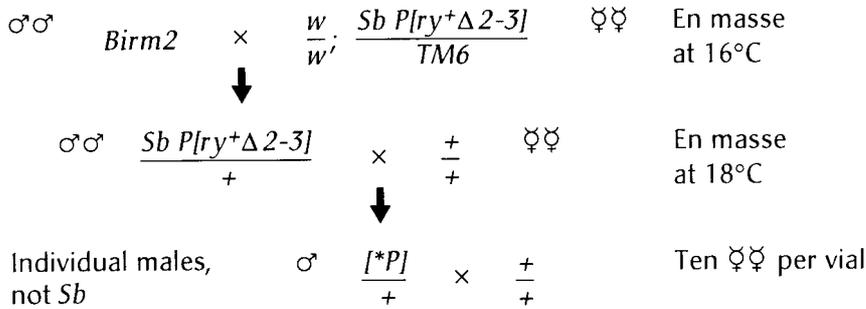
§2.3.5.1 通过位点缺失进行筛选

如果你事先对突变表型有所计划，那么找出一个突变的最直接的方法是诱变产生一个缺失使基因位点显露出来，如果这些果蝇不能存活，则此基因是致死的。若基因的表达是组织特异的，则可通过此组织及其表型检出。此时诱变剂很重要，因为突变在 DNA 水平容易检出。放射辐射用于此较好。

§2.3.5.2 克隆基因的插入突变

在已克隆基因处获得突变的方法之一是用 PCR 技术检出已知位点序列中的 P 因子插入。这种方法的遗传学道理跟增强子陷阱相似，而且无需其它的遗传工具如缺失或断点来分析突变的位点。可能有新插入突变的染色体用 PCR 方法来分析，用一个 P 因子周边序列中的引物及目标基因区域中的序列的组合来寻找在染色体上的重复片段。此方法的道理便在于除非有 P 因子引物且两个引物足够近，否则果蝇染色体中不存在这样的带。由于 PCR 很灵敏，可以对很多可能有插入的品系的 DNA 来分析。

值得一提的是下面这个交配，其中雄蝇有 17 个缺陷 P 因子，是在 16°C 下进行的。P 因子的移动由稳定插入的转座酶 P [ry⁺Δ2-3] 所引起。低温使得转座造成的杂交不育带来的致死性和雄性不育降低到了最低限度。



得到的雌性后代被一次从 10 瓶中取出，用于 DNA 提取和 PCR 分析。PCR 的引物是 P 因子的两个末端序列，它们从 P 因子的中间，方向朝外引发 DNA 合成，还有些引物是在目的基因序列内的（三个引物即可检出，能检测到插入的位点，这降低了获得插入的可能但增加了这种分析方法的可靠性，因为它排除了干扰和非特意引发）。如果有一个放大的带子则表明取样中至少有一只是有所需的插入的，随后采用同样的将果蝇分组的方法进行 PCR DNA 分析，肯定可以鉴定出想要的那一品系。在检验 PKA R1 调节亚基基因处的插入时，Goodwin 从 12000 只雌蝇中获得两只有阳性反应的雌蝇。由于 P 因子容易跳到邻近位置，这种方法在什么时候都管用。这种方法的一个变种就是使用了携带质粒挽回的 P 因子载体。在这种方法中，P 因子被转座，携带新插入的品系也已得到。然后从果蝇中提取 DNA，用质粒挽回处理。转化子然后用原来的克隆基因进行杂交和 blotting，这种方法提高了灵敏度。另一个改进是由 Dalby 于 1995 年提出的，他把有新插入的果蝇收集在一起，然后用 PCR 从这些插入的周围序列制作探针。这些探针再与克隆基因杂交，如此重复几次直至获得最终结果。这种方法从 16000 个新插入中获得了在 5 个基因区间的 11 个插入。

§2.3.6 突变的生化检验

当不好预见突变的表型时，直接分析突变品系的基因产物也不错。这时就没什么选择了，你必须在几十个有突变的品系中逐一分析。这种方法曾成功用于获得 Choptin 突变，用的是单克隆抗体。在有突变位点与缺失位点同源配对的果蝇中，其头部的匀浆用固相抗体分析。平均得率 1/10000。此法的一个变种是用 west blotting 而不是固相抗体技术。另外酶也可象抗体那样使用。

如果能预见头部表型，如致死或糙眼，可以用所有有此突变表型的突变体做预实验。这比分析每一突变要容易些。生化方法可以从中选出所需要的那一种或几种突变。

第三章 作 图

一旦你获得了新的突变，你就需要知道它在哪。如果不是在定点进行诱变，你就必须借助于连锁和重组分析了。

连锁分析的基础是孟德尔的等位基因分离定律——同源染色体不可避免的在减数分裂的第一次分裂时发生分离。因此当突变位于显性标记基因的相对染色体上，而这两条染色体间又没有重组发生时，它们将在每次减数分裂中分离。这种分离在雄蝇中因没有重组发生而不会有什么问题，而在雌蝇中重组对于基因分离的可靠性的影响可以用平衡染色体来排除。

染色体分离，就象所有其它生物学事件一样，不会跟理想状况相同。正常分离当然会发生，而不正常情况也会发生，尽管比例很低。如果有象转座或多重倒置等染色体重排现象发生，情况就会变得很麻烦了。在一定条件下，这种染色体不能进行正常的配对和分离。结果可能是要么有多余的遗传物质，要么就不够，遗传学术语称之为“非整倍体”（相对正常的染色体组分情况为“整倍体”）。如果非整倍体现象在染色体水平发生（如多或少一条染色体），则其卵常常是不可存活的，但 chromosome 4、XXY 和 XO 除外。此时，这种偶然的“不分离”现象在成体后代中不容易观察出来。

作图法亦可用于鉴别基因，如果有一个简便的方法来分析其蛋白产物或表型的话。这时这种方法则有赖于染色体重排造成基因位点的缺失或重排，然后以它做为突变的前体物。简言之，就是你先确定一个染色体区域，然后在此突变你想研究的那个基因。

§3.1 分离分析

在所有的果蝇杂交方案中，根据突变和显性标记检验的分离，来跟踪此突变检验的去向都是最为基本的方法。在前一章的诱变的讨论中已经说过，这样可以明确哪些果蝇携带此隐性突变。这种方法需要显性标记基因和第二，三染色体的平衡染色体。跟X染色体连锁的基因较容易看出来，因为在雄蝇中它是呈半合子态的。如果它是从父雄蝇处得来，则只会遗传给雌性后代，所以较易跟踪，而第4染色体通常不在考虑之内。也可以用排除法，如果一个突变不在第1, 2, 3染色体上发生，那么他必定位于第4染色体上。第4染色体也有一些显性标记基因如 ey^D 和 Ci^D ，但没有平衡染色体。事实上除了在三倍体情况中，它不会发生交换。

显性突变显然是比较容易作图的，因为它容易在下一代中观察到。你只须简单的将突变果蝇与在其它染色体上有显性标记的品系杂交，从后代中选出所有显性突变的杂合体雄蝇，然后与野生型的果蝇交配，观察下一代中的分离情况。因为用的是雄蝇，故不必担心发生使突变和标记连锁的交换。这一点是很重要的。事实上若有交换发生，而突变与同源染色体标记又相隔较远时，它们可能看起来就象在不同染色体上一样。下面是一个检测显性突变分离的例子：

$$\begin{array}{c} \frac{Dom}{+} \times \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco}, \frac{TM6}{Sb} \\ \downarrow \\ \frac{Sco}{Dom?}, \frac{Sb}{+} \times \frac{+}{+} \end{array}$$

Then score whether the new dominant segregates from *Sco* or *Sb*

检验突变发生在第二还是第三染色体上

P因子插入，不论是新的转化还是增强子陷阱，都可以用此法。因为这些品系通常都有野生型的 ry^+ 或 w^+ 标记，在 ry 或 w 突变背景上它们就成为显性的了。

$$\begin{array}{c} \frac{w}{Y'} \cdot \frac{P[w^+]}{+} \times \frac{w}{w'} \cdot \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco} \text{ or } \frac{w}{w'} \cdot \frac{TM3, Ser}{Sb} \\ \downarrow \\ \frac{w}{Y'} \cdot \frac{In(2LR)O,Cy}{P[w^+]?}, \frac{+}{+} \text{ or } \frac{w}{Y'} \cdot \frac{+, TM3, Ser}{P[w^+]?} \times \frac{w}{w'} \cdot \frac{+}{+} \end{array}$$

Then score whether w^+ segregates from *Cy*, *Ser*, or neither

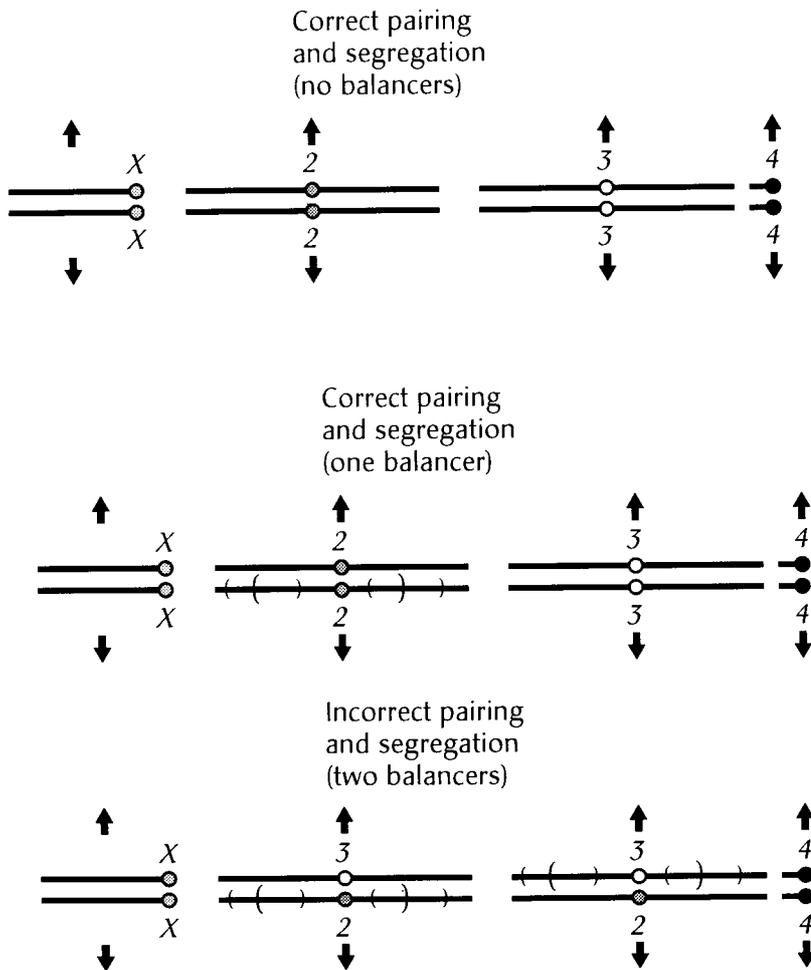
隐性突变的定位作图也不难，只须将突变和标记都弄成纯和的就行。也就是说，在检验隐性突变的分离时，你必须使杂合果蝇交配来看是否有突变存在。这就要求在杂合的雌蝇中必须用平衡染色体来做显性标记以防止交换的发生。

§3.1.1 平衡子问题

如果平衡染色体也是一点问题都没有，恐怕这本身就是问题了。尽管在分离分析和减数分裂作图时，不必考虑这些问题，而且该重点牵涉到这些问题应该是在下一章合成特定基因型时讲，但仍然有必要现在就提一提。其一便是重

组事件可以损坏平衡染色体，尽管概率很小。因此时常检查这些果蝇，看看其是否跟理想状况一致是个明智之举。只须检查相应的一些标记基因就行了这种举手之劳虽然看起来很烦人，但它实际上可以省去你许多的麻烦。你可以在整个品系崩溃前或在它已经影响到你的后续杂交之前发现问题。一旦发现有异常果蝇，要么将那一瓶扔掉，如果你的备份还正常的化，要么重做雌蝇一对一的杂交，从正常果蝇重新建立一个品系。

在你同时使用两条不同染色体的平衡染色体用于杂交时，会发生一个更常见的问题，两条平衡染色体同时杂合的雌蝇比只携带一条平衡染色体的雌蝇所产生的可存活后代要少的多。这时因为染色体减数分裂分离有赖于同源染色体间的交换。在没有重排存在时，X 的大部，第二、三染色体的全部在雌蝇减数分裂时会发生重组。当只有一条染色体上有倒置时，同源染色体还能正确分离。如果有两条染色体同时发生杂合倒置，分离就会变得一团糟，结果是错误配对错误分离，造成非整倍体配子和胚胎死亡。



连体 X 若同时和第 2、3 平衡染色体共存也同样会发生不正常配对和分离现象。而雄蝇即使全都是平衡染色体，也不会出现丁点问题。

第二个问题是：如果多个杂合的倒置出现在同一种果蝇中，则平衡染色体毁损的可能性增大。这是由于所谓的“**染色体间效应**”，即杂合重排抑制了某一处的交换，但同时增加别处交换的可能。虽然这种问题不是象异常分离那么普遍，但却不失为一个另人头痛的麻烦。而在减数分裂作图时，它将打乱正常的作图距离使低频交换发生的可能性增大，这时就不单单是一个头痛的问题了，简直是要命。

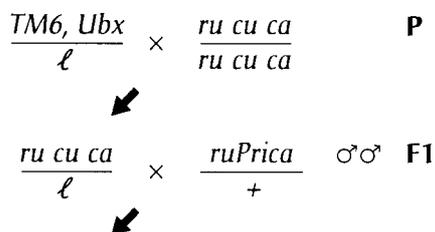
有什么挽救办法呢？你首先应该认识到用多平衡染色体的雌蝇做杂交是不利的，设计方案是要尽量避免。最简单的方法是**从雄蝇向下一代传平衡染色体**。如果你别无它法，那就用多多的果蝇杂交传代，然后严密监视之以防后代中出现平衡崩溃。

§3.2 减数分裂作图

一旦突变所在染色体被确定，在没有现成的已克隆手段或已知序列信息的条件下，确定突变基因染色体定位的最有效方法用**重组分析**。这需要一条多重标记的染色体，这些标记突变在染色体上顺序排列，还要另外一条在此染色体已有标记的基础上增加一个显性标记的染色体。基本策略是：**造出突变基因和标记染色体杂合的雌蝇**，这些基因在减数分裂时会发生重组，产生不同的重组染色体，其数目与基因间的距离成比例，这可以遗传到下一代并在下一代可以检测出来。

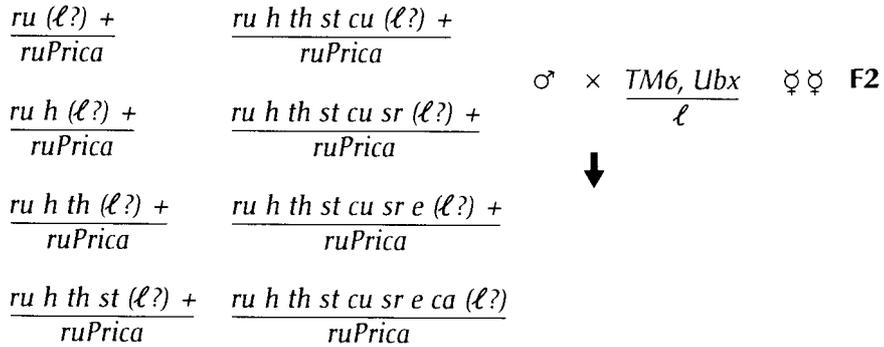
接下来的任务就是检测不同的重组染色体所占的比例，并据此确定新突变基因与标记基因之间的相对位置。为了获得最初的作图间距，只须将杂合雌蝇与携带有显性标记染色体的果蝇杂交。然后后代中携带有重组染色体的雄蝇可以被识别出来，并且仍用显性标记基因做标记（即选有 *Dom* 的雄蝇）。某一重组事件的发生可以通过有隐性纯和体计算出来。然后这些雄蝇便逐一单只与最初带新突变的品种杂交，以此来判断重组染色体新突变的有无。（事实上此方案将重组染色体上标记的检出与新突变的检出分成两步来进行）

下面举一例，因上述方法对某第三染色体突变作图定位，采用的标记染色体为 *rucuca* (*ru* 3-0.0, *h* 3-26.5, *th* 3-43.2, *st* 3-44.0, *cu* 3-50.0, *sr* 3-62.0, *e* 3-70.7, *ca* 3-100.7) 和 *rupica* (*pr* 3-90.0)



计算缺少 *Ubx* 和 *Pr* 的后代数目,看出重组染色体上致死基因的存在
 (这些列出的重组染色体只反映了一次交换的情形。实际上可能发生多次交换,但由于频率不高故上述方案仍然是管用的)

这种分析方法可以大致确定新突变所在的位置。更为精确的定位可以用区



间缺失或重复来进行,也可以仍采用上述重组方法,但用更大量的重组染色体来确定突变基因在两个相邻标记基因间的位置。

Lindsley 和 Zimm 所报道的作图位置是用染色体序号后跟一个标志减数分裂作图位置的值来表示的。这个值是通过把从最左端到最右端的作图值加起来大致描述基因在染色体上的顺序的。故某一位置的作图位置可能超过 50 个作图单位,尽管在单次作图定位实验中无人获得 50 以上的值。对这些数值必须谨慎对待。直接在特定位点间作图是唯一可靠的方法。减数分裂作图法使用的杂合雌蝇多在 25°C 饲养,此条件下重组频率高。

减数分裂作图比起分子作图就相形见绌了,后者需要特定位点的基因序列。而前者的作用就在于缩小基因的定位范围和确定某一突变是单基因的,而这只须少数标记基因和获得一个简图即可完成。一旦大致区间确定就可以用缺失或带标志的 P 因子在此范围的插入来进行更为精确的定位。

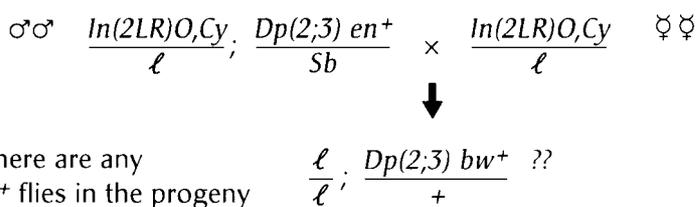
大多数的缺失是放射诱导的，另一些是化学诱变剂诱导的，而越来越多的则是不精确 P 因子剪切。这种剪切通常只产生很小的缺失，一般不会影响到一个以上的位点，哪怕是它最近的邻居。在 Lindsley 和 Zimm 的书中和最新的 Flybase 中有一些它们的记录。

对于有些不便于用现有缺失来检测的突变，可以合成特定的染色体缺失，而且也可以用不精确的因子剪切来获得新的缺失。

§3.4 重复作图

基因的精确定位可以利用覆盖此基因的两个断点间的染色体片段的任何类型的突变。而基因重复也可以用于此目的，只要隐性突变表型能被其野生型的重复所修复就行。重复现象在辐射诱变中是伴随着缺失出现的：一段染色体被切下来然后又被插入到另一处。

由于重复的挽回测试需要三个成分：二个突变等位基因和野生型重复，所以最好重复是发生在另一染色体上的插入。下面是这样的一个例子：第二染色

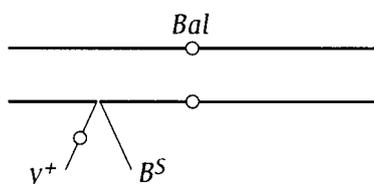


体上有 lethal 突变，而第三染色体上有此基因片段的一个重复插入。

如果有这样 (Cy⁺, Sb⁺) 的果蝇，这就表明 Dp(2;3)en⁺ 挽回了 ℓ 的纯和致死性。于是此突变可定位在此重复片段的两个断点之间。但这种方法并非绝对可靠的，因为如果有另一个致死突变恰好也在同一染色体上发生，（这个挽回的效应就观察不到了）。一个突变若只能挽回一个致死突变而不能挽回另一个则会导致假阴性。要避免这个问题，可以用一个不同的单独分离出来的此基因的等位突变，如果它存在的化，因为不可能有两个同样的随机突变发生。

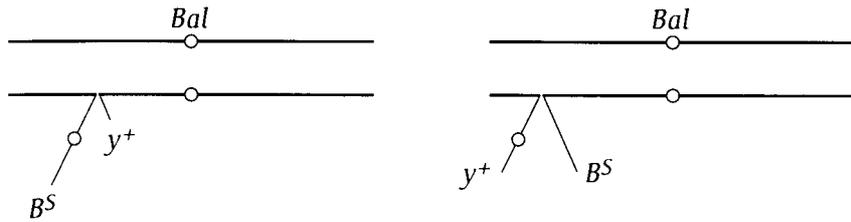
§3.5 重复或缺失的合成

现有的缺失和重复尚不能覆盖所有的基因。那些已有的缺失和重复可以从 blomington 的果蝇种藏中心。如果利用现有的这些缺失和重复还是不能解决你的问题，你还可以利用 Lindsley 等人所创建的果蝇品系来随心所欲的合成各种重复，缺失也可，只不过稍难罢了。这些果蝇是第 2 或第 3 染色体与携带有 y⁺

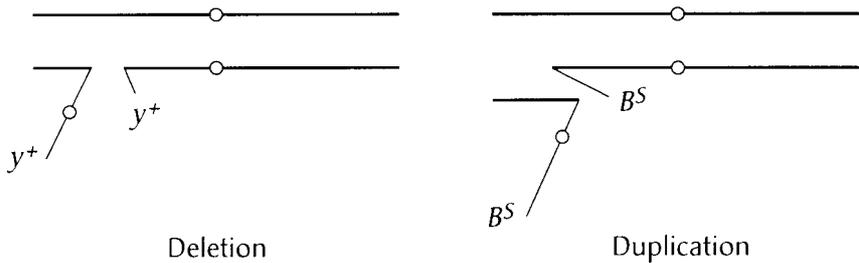


和 B^s 标记的Y染色体间发生易位而产生的,记作T (Y ; A)s。每个易位产物的一般结构为:

其中在Y和常染色体间有个相互易位,而且被打断的常染色体的两个片段分别与有一个互不相同的标记的Y染色体片段相连,且有一个着丝粒(如果没有着丝粒,此片段不能稳定遗传)。整条常染色体都还在,只不过已经被断为两段了。它们由合适的常染色体的平衡染色体来平衡。通过选择断点较近而且标记方向恰好相反(即常染色体同一端分别连上了 y^+ 或 B^s 标记,而另一端则正好相对),如:



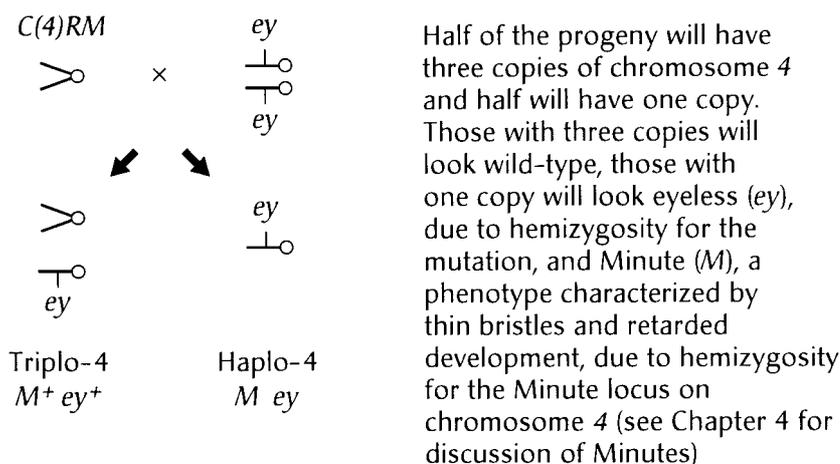
杂交后代中,一类得到易位产物的两个短端造成缺失:另一类相反,得到两端较长些的片段,从而造成重复。其余的几种组合方式都是整倍体。



缺失标记为两份 y^+ 而没有 B^s ,重复则双份标记 B^s 而没有 y^+ 。所获得的异倍体只占后代中很小的一部分,而且其存活率也比整倍体低。用类似的方法,Stewart和Merriam(1973)创建了各种T (X ; Y)s。

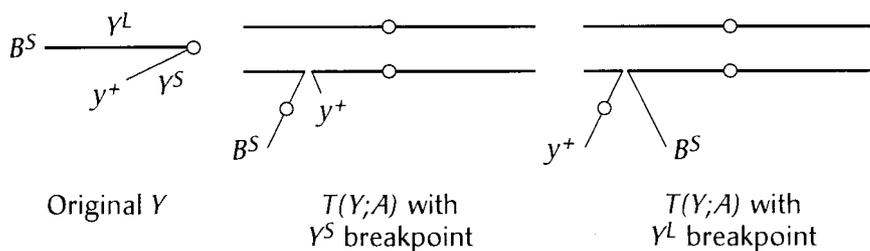
这些重排最初是用来研究果蝇基因的总结构和确定几个单倍致死(杂合缺失致死)的突变位点,其中一个还是三倍致死的(重复致死)。一般说来,在杂合态下大于100个编号区间的缺失和大于400或500个编号区间的重复都是致死的。但这仅仅是平均结果,因为有时有很长的重复也可以存活。

在克隆发明之前，这些果蝇被成功的用于鉴定神经生物学中的几种酶的结构位点，其原理便是“剂量效应”。这种方法有赖于一个事实即位点的重复和缺失是不可补偿的，也就是说某酶的位点若有重复则酶含量为正常的 1.5 倍。而杂合缺失的果蝇则只有正常的一半。（事实上这些值是不太准确的，平均说来重复为正常量的 1.3 倍，而缺失则为 0.6 倍）。30 种 T (Y ; A)果蝇的交配可获得一系列在染色体 2 和 3 上相互连续的重复。两种恰当的 T (X ;Y) 品种的交配也足以产生可连续的覆盖 X 染色体左半和右半部分的重复。第 4 染色体的情况可以在携带有粘连第 4 染色体 C(4)RM 和某第 4 染色体标识纯和的果蝇间的杂交中来考察，杂交后代中三倍第 4 染色体和单倍第 4 染色体的果蝇都有。



就是按照这种方法，乙酰胆碱酯位点，CAMP 磷酸二酯键和胆酰乙酯转移酶位点被发现。已有 CAMP 磷酸二酯键的细胞学定位与学习突变体 *dunce* 的位点一致，人们最终确定它们有同样的分子性质，是同一种突变。用这种方法做杂交时，最好事先做预实验来确认这些果蝇是否正常。这种方法比在单个染色体上直接实现重复或缺失要容易的多。Y-常染色体断点是较难定位的。表征重复或缺失的标记基因只是一个指示物，如果交配的两种果蝇中的断点相距太远，将不会有重复或缺失产生。如果相距有几个编号区那么远，则重复可存活而缺失不能，如此类推。更细致深入的考察可以记录重复后代果蝇中的雌性比例。

要搞清楚哪个标记基因指示重复哪个又指示缺失，只需看看易位中Y染色体的断点在那条臂上即可， B^s 在短臂 Y^L 而 y^+ 在长臂 Y^S 上：



这些果蝇在长时间存放会发生较显著的改变，但大部分不会，有些会丢失 B^S 标识，但只要有一两种有此标识则这根本就不是什么大问题。

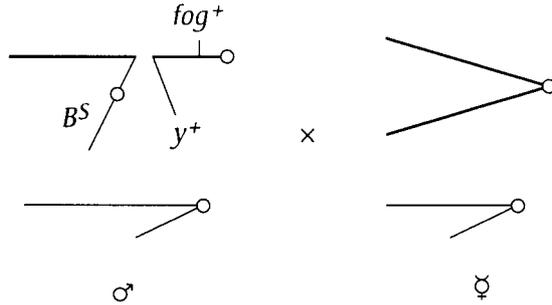
这种方法用于成虫果蝇无疑是效果不错的。可对于卵和幼虫来说 B^S 根本就看不出，而 y^+ 也只能是在三星幼虫的口部和刚毛中看出。故重复和缺失在这些未成年阶段不能辨别出来。除了少数只须看明显表型的情形，很多分析是不能用这种方法来完成的。

§3.5.1 通过缺失作图鉴定新的胚胎基因

大部分缺失是纯和致死的，这大大限制了它们在基于表型的新位点鉴定中的作用，除非其表型在死时仍可表现出来。对于胚胎发育，这还是可行的。事实从 25% 的杂合缺失果蝇的后代和 $T(X;Y)$ 的异倍体的后代有表型缺陷开始，人们已经鉴定了一系列新的基因位点。即使有多个基因被缺失掉了——一般的缺失也的如此——致死表型主要还是由某一种早期活动基因造成的。这完全可以通过在缺失区内分离单突变然后观察突变表型来证实，唯一的可能的制约因素是表型变异可能不大容易看出来。

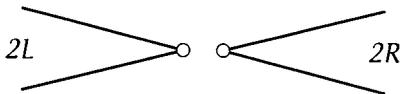
Sim 位点就是这么被鉴定的，最初是从对常染色体缺失杂合品系的胚胎的筛选开始的。死掉的胚胎被染上了色并做固定检测。腹部神经索的变异在 14 带缺失 $Df(3R)ry^{619}$ 的纯和体中被发现。而随后进行 EMS 诱变和在缺失区致死突变的工作证实了这个表型缺陷是单基因缺陷造成的。

更有甚者一个早期活动的配子基因也可通过缺失作图得到鉴定。无 X 染色体的胚胎的变异表型主要便是由此基因所引起的。无 X 胚胎很早就被知道是通过阻止成表皮期的细胞化来延缓发育的。而这种变型一致为当作是缺少 1/5 基因组而导致的综合症。Wieschaus 和 Sweeton 做了几个大的 X 染色体缺失，试图确认造成此表型的区域。他们将 $T(X;Y)$ 雄蝇与粘连体 X 的雌蝇杂交，在其后代胚胎中记下 fog 表型有无的比例，以此来推断胚胎中 X 染色体的比例。fog-胚胎不能形成后半部内脏，易于识别。



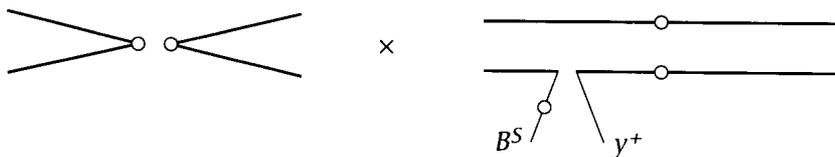
从母亲处获得 Y 而从父亲处获得 T (X ;Y) 的一个片段的果蝇胚胎将带有大的 X 染色体缺失。通过这种方法大致的定位之后，再进行精细的缺失作图。结果与人们所预料的相反，这个无 X 的胚胎性状可以归结到有一个有两个带的区间。而最终被确认为是 **culprit** 突变所造成的。

类似的此方法可以照搬到常染色体上。**Merrill** 等人用不同的染色体重排获得常染色体臂的完全或部分缺失。他们还使用了两条相同的左臂和右臂连于同一着丝粒这种复合染色体。这些品系中，复合染色体对于其上的隐性标记基因是纯和的，可以方便的确证果蝇有无被污染。

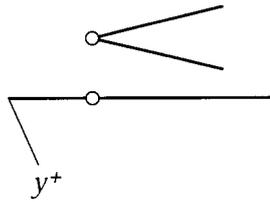


当此种果蝇中的雄雌两性进行交配时，有些会丢失 2L，另一些会丢失 2R（雄蝇中复合染色体臂的分离是随机的，而雌蝇中则肯定会分离，故而雄蝇产生的基因将有重排染色体的随机混合物，而雌蝇的则只有 2L 或 2R 而不可兼得）。

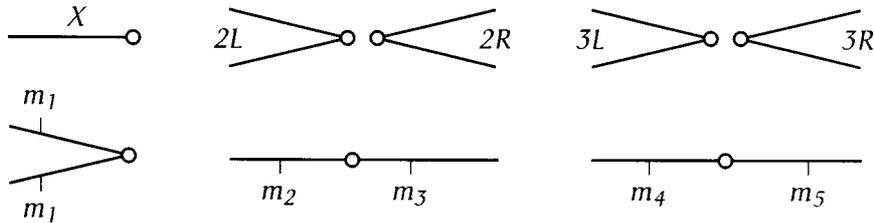
第三染色体也有类似的果蝇品系。为了监测不同类型的表型分离现象的发生频率，它们还可以与各染色体臂上的胚胎背壳发育模式突变基因的突变体进行交配。在这种分析中，**merrill** 等人确定了那条染色体臂携带有活动期早原肠胚形成的基因，就象先前 **nullo-X** 位点一样。通过将不同的 T (X ;Y) 和 C(2L,2R) 进行组合，他们得到某些染色体臂的稍小的缺失。



此杂交的子代胚胎中有一小部分其左臂的的远端全部缺失。



这种方法鉴定了七个造成原肠胚发育缺陷的位点和两个影响成细胞作用的位点。这些染色体是由放射处理得到的。要在其染色体臂上引入隐性突变，可以先合成正常染色体上携有隐性突变的三倍体雌蝇然后分析其交换产物即可：



§3.6 原位杂交作图

原位杂交技术已经象 P 因子插入位点作图中所用的连锁分析一样,成为一种标准方法了。它以最快速和最直接的方式来定位一个新的插入位点。但是突变表型必须通过切除，缺失和重组分析才能定位于某一插入位点。原位杂交技术已经在 Asbhmer 的书中有描述。

原位杂交所确定的细胞学位点用带号来表示，带号是依据果蝇幼虫唾液腺染色体的分带来确定的。在减数分裂的图谱位置和细胞学上的带的位置间的关联不是简单的对应，它随染色体上的位置的变化而不同。在 Flybase 中可以查到具体的对应方式。

第四章 合成特定的基因型

只有能熟悉合成特定品系和制造新重排染色体的艺术，那么一个果蝇遗传学的高手才能算是达到了他的顶峰。Ed Novitski 就曾经定了一个标准，要合成一个将所有二倍体基因组中的染色体连到一个着丝粒上，尽管尚未实现。很显然，这种果蝇进行的减数分裂是个痛苦的过程，果蝇将很难存活，但是其基本原理却被证实了。

大多数情况下，复合品系的构建只不过是几个染色体组合到同一个个体果蝇中。这乍听起来是容易的，操作起来就麻烦得多，需要事先计划好。常有这种情况，我想我三下五除二做几回杂交就能得到新的品系，结果只做了两代就分不清果蝇的基因型，最后不得不按正确的方法重新来过。

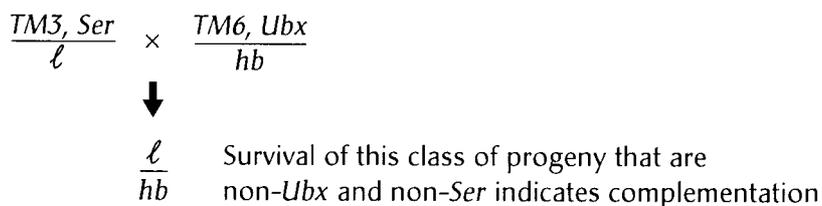
准确的区分各种基因型是果蝇染色体操作的核心问题。正是根据一些特点才能将某种特定遗传特征的果蝇同别的果蝇分开，而这对于发现果蝇的全部秘密是重要的。

原理

设计果蝇交配方案有点象做有机化学题目。你必须搞明白如何用最经济和最可靠的步骤将几种初始材料组合成最终的产品，同时在每一步中你必须在下一步处理之前纯化你的阶段性产物（如果这种关于有机化学的比方让你觉得难受，没关系，果蝇杂交要有趣的多，而做起来也会让你更满意的，而且你还可以在参加那些令人厌烦的学术活动或实验室组会时来做）。

单染色体的简单操作

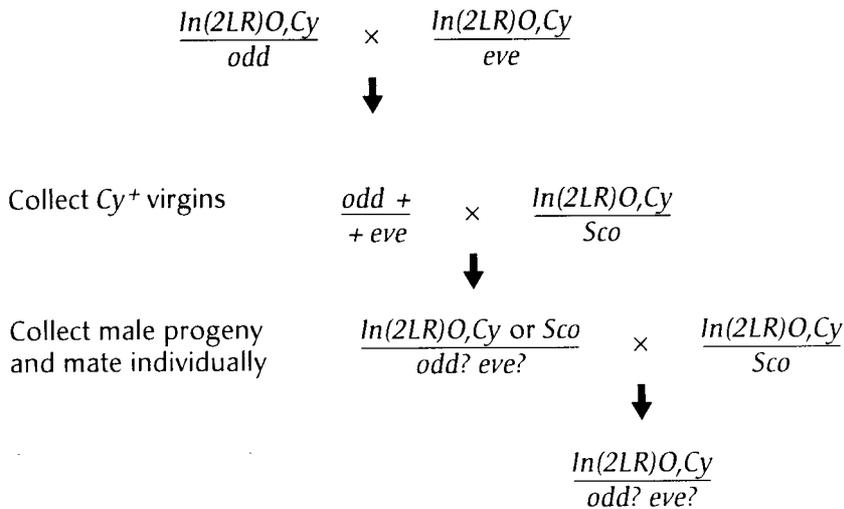
这是最简单的果蝇操作了，基本上跟第二章所讲的分离突变体和补偿测试一样。下述的互补检测即大致描述了其原理：通过显性标记的有无来鉴别子代的基因型



此杂交的关键在于每一基因型可以由特定的标记组分来区分——这当然也是一般都有要求的。

连锁突变

另一种常见操作是将两个突变组合到同一染色体上，这在双突变体测试和将标记基因连接到某一突变进行嵌合体分析时是必要的。在最简单的例子中，这种处理只须获得两个突变基因的双杂合雌蝇。然后在其后代中找出些可能有重组染色体的个体并检验其中有无双突变连锁的个体。下例中两个突变 *odd-skipped* 和 *even-skipped* 在第三染色体被连在一起。



现在马上就有一个问题：要准备多少瓶果蝇才能获得并确定这个重组染色体？答案是这取决于两个突变间相距有多远。离得越远你越可能得到你想要的产物。本例中 *odd-skipped* 和 *even-skipped* 相距约 50 个作图单位，等于说是没有连锁。所以你可能在 10 瓶杂交果蝇中发现你想要的，但应准备至少 20 份。

对于相距更近的位点，你应当相应的多做一些以确保你能得到你的那个重组。其期望值是图距的一个简单函数：若为 5 个作图单位远，重组可能为 5%。你应当可在 100 个系中发现它们，但我建议你最好做 200 个。如前所述，**交换频率是对温度敏感的，高温和低温都能促进他升高。故邻近位点的重组可以通过在 30°C 下培养双杂合雌蝇而得到促进。**注意是高温下培养，而不单是成虫在高温下进行杂交，因为温度的这一效应并不在成虫期有效。从另一方面来说，如果果蝇在整个生命周期中都是 30°C 培养，其产卵率要降低 2 折。故最好是在大部分的幼虫期将瓶子移至 30°C 下——也就是在你发现食物开始被翻动时开始到你发现瓶壁上开始结蛹止。高温效应在着丝粒附近和染色体臂两端最为显著。

另一个增加重组频率的因素是存在另一个染色体的杂合倒置。这种染色体间效应增加了重排区域以外的基因重组频率。

有时可以用一些可见的标记来帮助辨认不可视的隐性突变间的重组，这很容易办到。例如，你已经对突变进行了减数分裂作图，故你已经有携有各种标记和你的突变基因的染色体，随后的杂交就很容易进行了。

两条染色体的操作

要同时控制两种不同的染色体的基因型，有必要事先安排好杂交方案。这里我们将要利用平衡子、显性标记、雄性无重组和雌性同源染色体可靠分离等性质。作为例子，我们将考虑如何获得第三染色体上的 *ftz* 和第二染色体上的 *eve* 双突变胚胎。

大多数突变携带果蝇是既有突变基因又有其对应的平衡染色体，例如 *TM3;Ser/ftz*。这是最好的保存方法，因为其它染色体上的显性标记和平衡子只是影响果蝇的成活率而已。要同时操作两种染色体，就有必要引入其它一些平衡子和显性标记，为的是能清楚的确定初始染色体的去向。因此手头上有些本身就带有平衡子或标记的果蝇是很有好处的，例如

$$FM7a; \frac{TM6, Ubx}{Sb} \text{ or } \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco}; \frac{TM3, Ser}{Sb} \text{ or } \frac{In(2LR)O,CyO}{Sco}; \frac{TM6, Ubx}{Sb}$$

可是由于多平衡子的共存会影响雌蝇的正常减数分裂，故这种基因型的果蝇如能用雄蝇就应尽可能用雄蝇。其技巧性便在于用初始的突变品系与另一个有不同标记的品系进行杂交，如此，你就能发现携带突变的染色体与其携带标记的同源染色体发生了分离。

Cross #1

$$\text{♀♀ } \frac{TM6, Ubx}{ftz} \times \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco}; \frac{TM3, Ser}{Sb} \text{ ♂♂}$$

↓

F1 ♀♀ $\frac{In(2LR)O,Cy}{+}; \frac{TM3, Ser}{ftz}$

Now the F1 virgins from Cross #1 and the F1 males from Cross #2 can be mated to yield a stock for producing double mutants:

$$\text{♀♀ } \frac{In(2LR)O,Cy}{+}; \frac{TM3, Ser}{ftz} \times \frac{Sco}{eve}; \frac{TM6, Ubx}{+} \text{ ♂♂}$$

↓

$$\frac{In(2LR)O,Cy}{eve}; \frac{TM6, Ubx}{ftz}$$

收集其雄蝇和处女蝇，这些果蝇将形成一个平衡致死品系。尽管不是很健康。后代中 1/16 的果蝇是 *ftz* 和 *eve* 双纯和的。如果 *eve* 突变抑制了 *ftz* 突变的致死性，即使只有 1% 的比例，它仍可以毫不含糊的根据标记检查出来。独特的标记可以使得每一步的每种基因型都能被辨认出来。

可是如果你想要的是双突变的胚胎，这些成虫标记将变得毫无用处，你想要的结果可以很简单的由两个初始品系交配得到，而且存活率要好，如下图：

$$\frac{\text{In}(2\text{LR})\text{O,Cy}}{\text{eve}}; \frac{+}{+} \times \frac{+}{+}; \frac{\text{TM6, Ubx}}{\text{ftz}}$$

↓

$$\frac{\text{eve}}{+}; \frac{\text{ftz}}{+}$$

这个简单方法的不足之处在于双突变体的表型跟单突变体的无法区分。为了解决这一问题，可以用带有表达 *lacZ* 的 P 因子的平衡染色体，于是当后代从由 *In(2LR)O,Cy P[lacZ]/eve; TM6,Ubx P[lacZ]/ftz* 构成的品系中被挑出时，它们是可以根据被 β - 半乳糖苷酶染色的情况来区分的只有那些被染上的是双突变。

一旦你要计算存活率时，或是要检测少量有某一特定基因型的个体时，或是发现某已知表型的单个后代个体时，标记的作用就明显了。

另一个被利用操作第 2 和第 3 染色体的工具是 *T(2;3)CyO; TM9*，它是 *In(2LR)O, Cy* 和 *TM9* 之间的一个相互易位。作为两条平衡染色体间的相互易位产物，它在受精卵中所有的易位片段必须都同时存在以保证可成活——否则配子便是异倍体会死亡。由于它包含了两条染色体的全部序列，它可以有效的平衡第 2 和第 3 染色体，保存的品系应当是这个样子：

$$\frac{\text{T}(2;3) \text{ CyO}; \text{ TM9}}{\text{eve}; \text{ ftz}}$$

当得到 P 因子转化子后想看某一基因克隆是否挽回了某种突变表型时，操作两条染色体就是完全必要的了。然后，你可以用 P 因子中可见标记作为显性标记，当然这要求杂交中的所有果蝇的 X 染色体上 *white* 基因是突变的。

例如，你得到了一个在第 3 染色体上有 *P[w⁺,odd⁺]* 插入的转化品系，你想要构建一个第 2 染色体上 *odd* 突变纯和而第 3 染色体上又有这个 P 因子的果蝇品系，则若初始果蝇均为 *w* 纯和的突变就会带来不少便利。通常对于 P 因子携带果蝇，它很可能已经携带了 *w* 突变了。

杂交的第一行是两种交配同时分别进行的缩写，用同种基因型的雄蝇。最后一行表示你得到了雄雌两种蝇，它们检验了P因子挽回的效果。如果odd/odd ; P[w⁺,odd⁺]/+ 的果蝇可以存活，则插入可以挽回此突变。

多少只果蝇

由于使用了多个标记和平衡子而带来的存活率问题前面已有所提及。一般说来这些东西越多，果蝇就越虚弱。果蝇越虚弱，你开始实验时需预备的果蝇就该越多。否则你将会发现在你做了三个月的多代杂交后，你只剩下一只基因型对头的雄蝇，而它还是不育的。

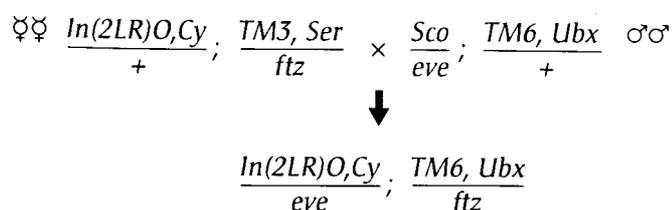
其实你只要算一算每次杂交后所想要的果蝇在果蝇总数的比例，你就知道要得到那么几只果蝇有多困难。一般从理论上讲这个比例为 1/8 或 1/6，而标记基因和多平衡子造成的非同源染色体分离又使存活率进一步下降。跟克隆不同，中间产物不能在每步都进行扩增，所以你在开始时必须用足够多的果蝇以保证你能完成整个方案。

一个好办法是预先定个目标：在最后一代中至少要一满瓶果蝇进行杂交。考虑到存活率问题，一瓶杂交果蝇大约要 40-50 只处女蝇。如此反推回去，双染色体操做的杂交方案的第一步应该是准备数瓶，每瓶 100-150 只处女蝇。

哪种性别

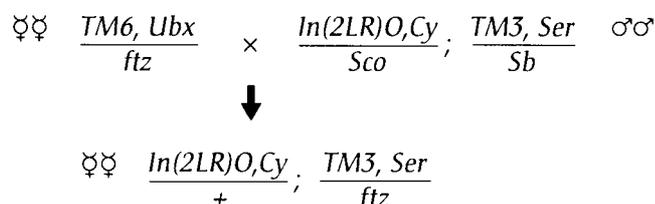
在每一步该挑选哪种性别的果蝇受几种因素的影响。一个是已经提到过的雄蝇无交换，这使得**显性标记染色体在雄蝇中可当做平衡染色体来用**。另一个因素是雌蝇中多平衡子带来的麻烦，此时雄蝇是唯一的选择

第三个因素是非处女蝇问题，尽管你尽了全力仍不能保证有几个非处女蝇成为漏网之鱼，这么几只老雌蝇足以把整个杂交搞砸，因为不同的基因型有同样的标记从而搞混。若仔细对每一步杂交加以研究，就可以清楚的发现某些情况下老雌蝇的出现没什么影响，因为你想得到的基因型的是被独特的标记上的，无论其母是否进行了其它的交配。但这不足以成为你在每次交配中挑选处女蝇的借口，你该想想你想要的果蝇在同代果蝇占多么小的比例。这只不过是使整个杂交能顺利完成所做的一个考虑罢了。举例如下

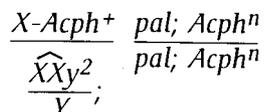


想知道你是否在冒险吗？考虑一下你想要寻找的那个标记（Cy，Ubx），看看有无可能从一个非处女蝇得到它。为此你必须考虑产生这个处女蝇的上一步杂交，这一步杂交有哪个混蛋雄蝇又跟它们在一起。是否是 $In(2LR)O,Cy/+ ; TM3,ser/ftz$ 处女蝇和有 $TM6,Ubx$ 的雄蝇交配，故而你能在非处女蝇后代中得到带有 Cy 和 Ubx 的果蝇呢？此时上一步杂交是
很明显，处女蝇可能已经与 $TM6,Ubx$ 雄蝇交配，故产生有同样标记的而基因型不同的有误导性的后代。所以你是在冒险，在挑选处女蝇问题上你该格外小心才是。

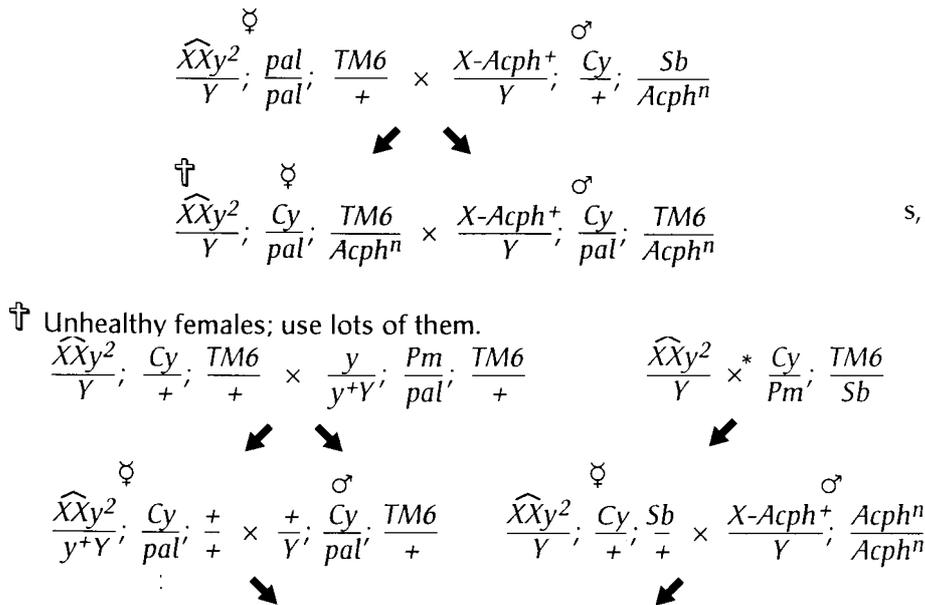
三条染色体的操作



正如杂耍中玩四个球比玩三个球难得多，同时操作处理三种染色体比两条要难的多，所幸的是三染色体操作很少用到，同时操作四条染色体就更没有听说过。虽然原理都一样，问题却多得多。要得到那种很独特的容易区分的基因型更难了，而你最终得到仅一只不育的雄蝇的可能性却大大增加了。如果你不需要这种深奥的技术，或是你对这种东西没有任何兴趣，你可以将本节跳过。这种繁杂的杂交在某些嵌和体实验中有用，为了造成雌雄两性嵌和体，而合成了这些果蝇品系。而且这些果蝇利用 X 染色体的重复来覆盖常染色体的隐性突变。因此，当 X 染色体嵌和被诱导形成，这个嵌和体对于那个常染色体位点也是嵌和的。Kankel 和 Hall 在神经系统的命运决定图研究中运用了这种系统，它是以 Acph 酶作为标记的。它们想要得到的果蝇是：



X-Acph⁺/X[^]Xy²/Y表示此品系中雄蝇有X-Acph⁺/Y而雌蝇有X[^]Xy²/Y。Acphⁿ是已经是嵌和态的突变，它是碱性磷酸酶的突变，可作为发育谱系分析的组化标记。X-Acph⁺是携带有Acph重复的X染色体，pal是造成嵌和的突变父性缺失。要得到嵌和体，此种品系中的雄蝇与y; Acphⁿ雌蝇进行杂交。为了后人能学着一点，Hall的杂交方法在下面作图表示出来了。它又长又难懂，权且把它当成一个挑战，当作对你果蝇遗传知识的一个考验。如果你还是搞不明白，别灰心这种杂交根本就没什么人用的，大家也没有几个搞得懂的。



诱导缺失

要想诱导缺失，最好的方法是打电话或 email 给 Bloomington 的果蝇贮藏中心，让它们寄给你。这种方法要是不可行也没关系，用辐射或化学试剂诱导缺失跟诱导突变没什么不同，你可以用补偿测试来检查那些被处理过的果蝇。如果你从野生型染色体开始，想获得包含一个容易观察和记录的标记基因的缺失，只须先诱导处理正常雄蝇，然后与标记基因纯和的雌蝇交配，检查有标记表型的后代即可。下面再以第二章的例子为例，即所谓的 F1 代筛选。这里这么做的道理在于一个缺失通常是跨好几个位点的，发生频率不是很高，基本上是纯和致死的。故而你费些心思就可以从 F2 代挑选出那条染色体。可能挑选 10000 或更多的诱变染色体。这里有个制约因素即只适用于可见标记，但由于缺失是很难得到的，因此找一个方法来利用可见标记是很值得的。

Mutagenized males $\frac{+}{+} \times \frac{en^1}{en^1}$ en^1 is a viable allele of the engrailed locus, a locus that can mutate to lethality

$$\frac{en^1}{-()-}$$

$$\frac{en^1}{-()-} \times \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco}$$

$$\frac{In(2LR)O,Cy}{-()-} \text{ or } \frac{In(2LR)O,Cy}{en^1} \text{ or } \frac{Sco}{-()-} \text{ or } \frac{Sco}{en^1} \times \frac{In(2LR)O,Cy}{Sco}$$

$$\frac{In(2LR)O,Cy}{-()-} \times \frac{In(2LR)O,Cy}{-()-}$$

在你想要的缺失区中或附近的显性突变也可以同样使用。此时你筛选那些没有显性突变表型的果蝇就行了，这也可以用F1 筛选来做。（注意有些显性突变，比如由于单倍不足造成的Ubx和Minutes是不行的。显性突变应当是那些功能获得突变、超效等位、新效等位和反效等位基因等突变类型）。注意P[w⁺] 处女在w突变果蝇中是显性的。由于这些插入的分布很广，现在可以在任意一个地方反转这个显性性状。

诱变剂中辐射是较为常见的缺失诱变剂，比化学诱变剂可靠，尽管 4000r 剂量下发现缺失的可能性只有 1-5/10000。大约有一半的 x-ray 诱导缺失是多位点缺失，大片段比小片段少。象在其它的诱导中那样，成熟的精子是对诱导最敏感的。EMS 一般认为是点突变的诱发剂，但也可以产生小的缺失，通常这种缺失是基因内缺失，故 EMS 突变是诱导无效等位突变的好方法。

P因子切除也是一个广泛应用的小片段缺失诱导方法。不准确切除所造成的切除一般很小，常是基因内的，但有时也能产生稍大的缺失。这种缺失事件

$$\frac{w}{Y'} \cdot \frac{P[w^+]}{TM3, Ser} \times \frac{w}{w'} \cdot \frac{Sb P[ry^+ \Delta 2-3]}{TM6, Ubx}$$



Select Ser⁺ Sb males $\frac{w}{Y'} \cdot \frac{P[w^+]}{Sb P[ry^+ \Delta 2-3]} \times \frac{w}{w'} \cdot \frac{TM6, Ubx}{Sb}$



Select w, Sb⁺, Ubx males and mate to balancer stock to test for lethality $\frac{w}{Y'} \cdot \frac{-()-}{TM6, Ubx} \times \frac{w}{w'} \cdot \frac{TM6, Ubx}{Sb}$

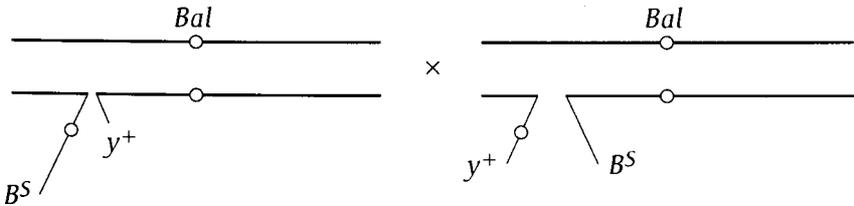
的发生频率就如同P因子转座一样不可预知，而且很大程度上依赖于插入位点。切除方案是以P因子中的w⁺为标记来制定的，跟先前所讲的P因子插入诱导的道理差不多。对一个第三染色体上的致死插入方案如下：

获得这种P因子切除的频率依赖于P因子序列和插入位点。精确切除对不精确切除的比率是不确定的，但似乎是利于不精确切除的。对于那些不精确切除，更多的是在P因子内进行，留下一小段 P因子，而不是造成缺失。故诱导缺失的成功率是在 10%的可筛选染色体中有 0.1%的可能是缺失，你自己去换算吧。如果P因子所在染色体不能与其同源染色体配对，而且把它当作修复模板，则不准确切除的频率会增加。上述的筛选方法的一个优点在于它可以同时检验切除(w⁺丢失)和致死性。

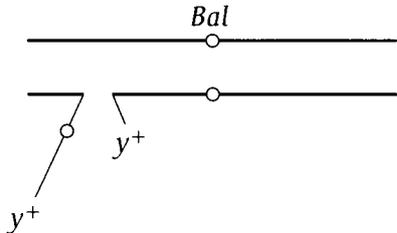
能否发现一个缺失取决于你要检查的是那个被覆盖基因位点。若是你想要的缺失包括了一个单倍致死位点，那你的麻烦就大了。如果是缺失包括其它一些单倍缺陷位点，比如不育等，那也是一样。即便是只有一个位点被缺失，如果它是单倍剂量异常的，比如 Minute 你也将会很麻烦。

按照最好从已有重排获得新的重排的原理，T(Y ; A)可以作为获得缺失的一个很好的出发点。

通过杂交两个断点不同的 T(Y ; A)可以获得缺失



这两种果蝇看起来都有y⁺和B^S标记。携带缺失的后代将有双份y⁺和B^S。



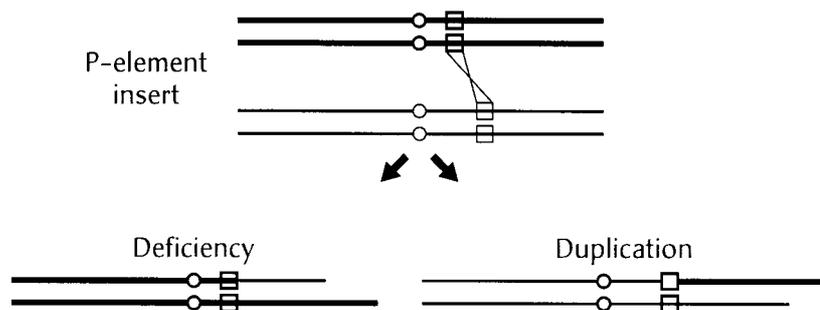
可以收集这种y⁺和B^S的雄蝇和处女蝇并有之建立一个品系。可是由于其后代中会有很多异倍体，所以这个品系不易繁衍扩大。由于通常所需要的是为筛选新突变而用的缺失，或者有时是需要大量的果蝇时，这种存活率会带来麻烦。

事实上完全可以用辐射处理把这种果蝇中的常染色体片段重新连在一起。这种事件的成功率可比从新开始诱导缺失高得多，因此 Y 染色体臂是个很大的目标而且此时诱导的试剂上是交换。由于放射处理时需要 T(Y ; A) 的两个常染色体片段同时存在，故一般都用雌蝇，为了不损伤卵母细胞，剂量降为 1500 r。

用一个基于恢复可育性的筛选方案有时会使这种重连接现象更容易发现，因为未发生重连接的果蝇是不育的。重连接果蝇只须根据 y^+ 的丢失来筛选即可。因此你只须首先收集这些不健康的合成缺失果蝇的雌蝇，放射处理之，交配之，然后检查子代的 y^+ 就成。由于这种果蝇始终是被平衡的，故其子代也是生来就已平衡好了的。然后检验证实它确实是重连接了的，只须将它们与其亲代 T(Y ; A) 果蝇之一杂交，看看有没有异倍体即 y^+ 和 B^+ 分离与否即可。

§4.5.3 从 P 因子合成缺失

P 因子的应用使缺失诱导达到了一个新的理论水平。由于它们的染色体位置十分清楚，因而重排的目的产物也十分清楚。简单的一次杂交即可使之插入到一个新的位点。更重要的是有那么一个非随机的概率：转座现象一般在离原插入较近的一个区域发生。这就意味着如果有那么一个催化染色体在 P 因子插入位点发生断裂和重新连接的机制，则可以由此发明出一个通过不等交换而合成缺失和重复的技术来。



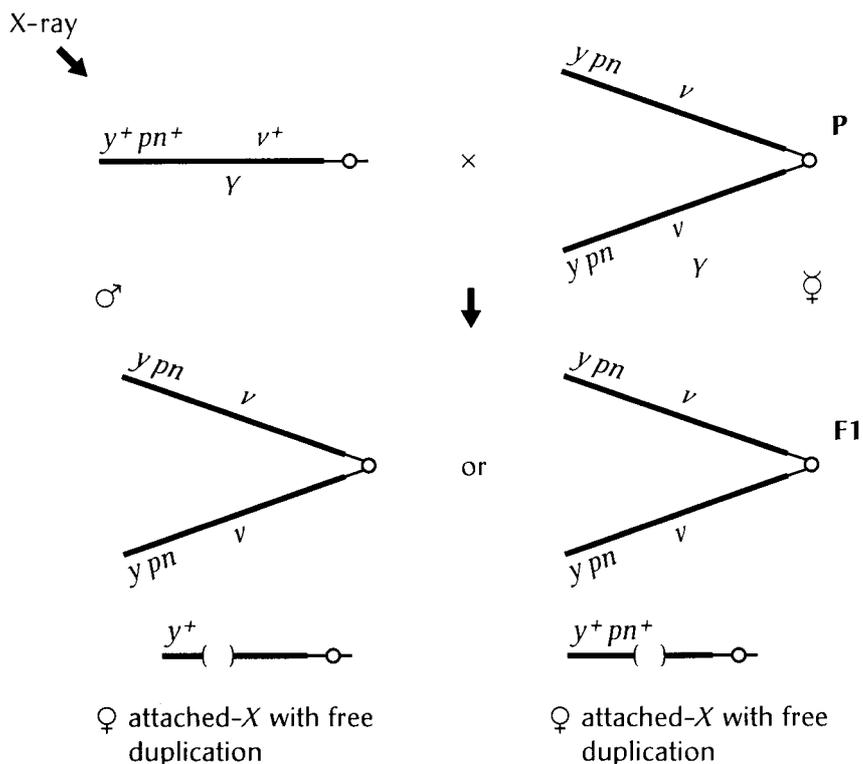
Golic 设计了一种利用 P 因子进行染色体间重组的方法。他引入 FRT(yeast flip recombinase target) 到 P 因子上，获得了一系列在不同位点有此序列插入的转化果蝇。然后他利用插入的 P 因子在被转座时一般都重新插入到附近区域这一原理，当两条同源染色体上的插入相邻近时，激活 FRT 重组酶，于是同源染色体间就可能发生不等重组，结果得到一个缺失和一个相应的重复。

获得转座的几率与位置和初始插入序列的组成有关。所获得的转座率在G1代雄蝇为 18/97 到 97/104。其中 86%的情况是转移到染色体的邻近区域。当利用不同但又相互靠近的插入的杂合体，获得缺失和重复的概率为 0.7%。尽管不是很高但也不低了，而且重排区域是已知的，这是一个很大的优点。

§4.5.4 诱导重复

稳定的重复有时可在 X 射线诱导缺失时发生。缺失中切下的片段有时会插入到另一染色体上。当发生切除和发生插入的两条染色体分离开来时，重复和缺失就发生了。但在寻求某一特定的重复类型时这种方法不大常用。

X染色体的游离重复是最容易诱导的。它们是一些小的X片段，保留有着丝粒和有 y^+ 位点染色体末端。这种技术基本上是由于切除X上的片段，从而得到一个自由分离的微型染色体，它可以在y突变的背景上由 y^+ 显示出来。有了这个标记那些有游离重复X的果蝇很容易挑出来，因为果蝇尤其是雌蝇对大片段染色体的重复比较强些。其基本思想如下：



这里仅从许多可能产物中画了两种，一个 y^+ 重复和一个 $y^+ pn^+$ 重复。它们分别代表了子代中雌蝇的各种可能基因型。如果不是全X染色体重复，这些游离重

复果蝇是可以存活的。通过与有多重标记的X染色体的雄蝇杂交，还可以分析此重复到底涵盖了哪些位点。

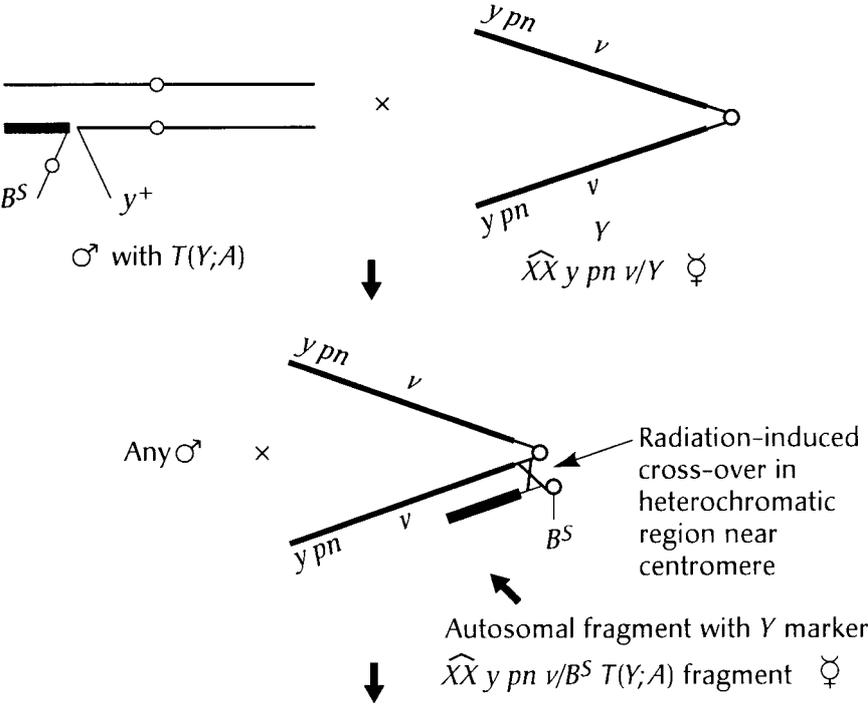
可以设计一些基于重复可挽回单倍缺陷表型的筛选重复染色体的方案。除非有另一个正常基因位点存在，否则在此方案的所有的无平衡子代中，将会出现一个已被平衡了的单倍缺陷基因位点。故对野生型果蝇的放射处理及随后的与已被平衡的单倍缺陷位点的杂交，将显示出有一个新的重复在既无平衡子又无单倍缺陷的子代中存在。

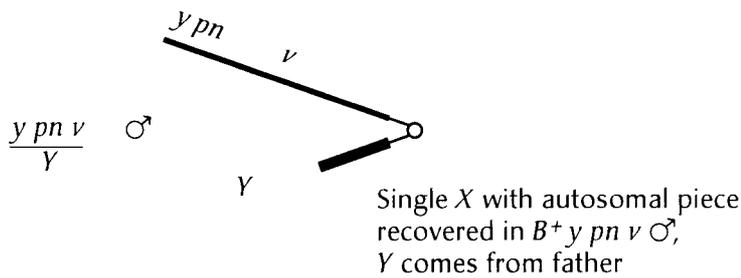
§4.5.5 从 T(Y ; A)s 合成稳定的重复

对于重复，重连接 T(Y ; A)诱导稳定缺失的原理也可以照搬，但尚未有人试过。那些断点靠近染色体臂两端的 T(Y ; A)可以用于将一个常染色体片段连到 X 染色体上。

这一技术有赖于连体 X 分离及 T(Y ; A)的 Y 染色体的异质区部分和邻近连体 X 着丝粒异质区的交换，还要用点辐射来帮帮忙。异染色区间的同源性不高，重组率较低，但可以在放射处理时有所增加。

大多数粘连的 X 染色体并不适合于这种处理，因为它们为中心异质区一般都全部或大部的发生缺失或重排。理由很明显：**连体 X 一般是跟游离的 Y 染色体在一起而得到保存的**，如果发生异染色体配对和交换则它们将分离。适合于这种技术的特殊连体 X 将保持其中心的异质区，故而不适于正常的品种的保存，例如 C(1)RM,ypnV。在此技术中，你只须将 T(Y ; A)和连体 X 果蝇杂交，放射处理雌蝇，然后使之与无标记雄蝇交配即可：

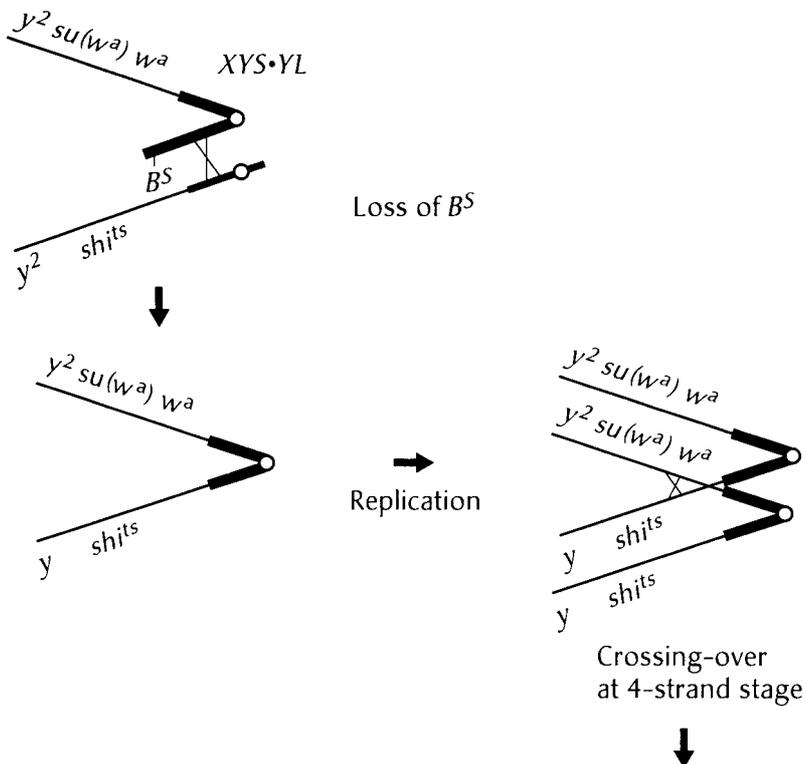


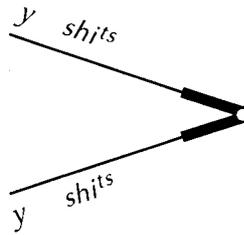


结果是一个X染色体与常染色体末端片段连在了一起。因为除非连体X解体，如果有断点雄蝇将不会出现连体X上的隐性标记，所以它还是比较好认的，也就是只需寻找有 $y pn v$ 而没有 B^s 的雄蝇即可。存活果蝇的重复片段的大小取决于此重复来自哪条染色体臂。

§4.5.6 合成复合 X

合成连体X的一个新的方法便是用上述的方法使整个过程反转过来就行了。为什么要合成连体X呢？比方说你用一个携带有一个温度敏感的致死突变的连体X，由此你可以使其后代中只有雄蝇而没有雌蝇。具体说就是用一条携带有此突变的X与另一条带有 B^s 标记的Y染色体粘连的X进行重组。

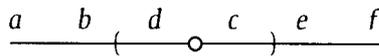




单只雌蝇后代中B^s的有无容易看出，并可据此开始新的种系。两条臂杂合的连体X是不能长久的，因为复制后会发生交换，结果产生有不同标记的各种纯和连体X。这时你同样可以由单只雌蝇来开始一个新的品系并可检验它是否带有那个温度敏感的致死突变。

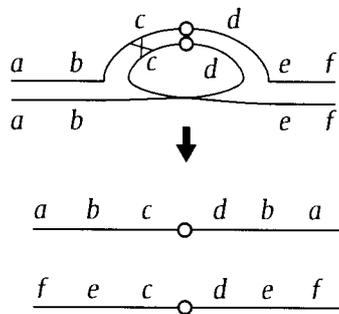
§4.5.7 Autosynaptic chromosome and Joys of Gibberioh

果因遗传学更生僻的一个领域是从臂内倒位染色体来合成重复和缺失：

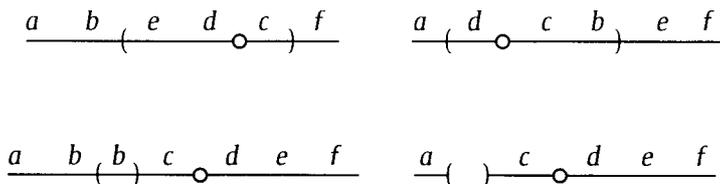


自从 Sturtevant 和 Beadle 对倒置载体的经典和广泛的研究以来，倒置染色体的简单分裂行为就对染色体机制的狂热研究者们有特殊的吸引力。

臂内的倒置可造成异倍体，因为其染色体会产生相互的重复和缺失产物：



如果几个不同的臂内倒置同时出现，则有可能使两个倒置间不同的染色体部分发生顺序重复或缺失。



这种情况下要发生一系列的交换事件，详见 **cramer** 和 **Asbumer**。此技术的优点在于目的性强，不是随机的。但是合适的臂内倒置类型却不容易得到。当然也可以人工合成，但却不那么容易得到。

第五章 突变分析:等位基因的特征

做果蝇遗传学的一个主要原因是分析突变体。进行两项测试：突变缺失的表型特征及基因的定位。本章主要处理第一个问题，第二个问题将在第六章解决。

突变的分类

分析定位基因的先决条件是，你必须有一个或多个等位基因。事实上你会发现是越多越好。突变分析的历史象果蝇遗传学的其它方面一样，始于先知 H.J.Muller 的工作时代。Muller 意识到通过对比表型和不同等位基因间的相互作用能推断出基因的大部分本质。20 年代末 30 年代初当他发展他的学说时，主要是为了理解基因到底是什么。在 50、60 年代，这一方法成为微生物遗传学的主流，在早期细菌的研究调控方面扮演着主要角色。如今这一分析在分析基因如何起作用方面极有效，并用来解释果蝇和昆虫的发育途径。

无效等位基因

完全消除基因功能的突变是无效等位基因。从分子上这通常可以通过抑制基因的转录或翻译，比如错义或无义突变而得到。总的来说，无效的基因也许是最可能被分离的一种突变。这好比有许多方法来破坏转基因蛋白的功能或抑制其表达，而相对而言使之稍微改变功能的方法则要少得多。在那些容易分离许多等位基因的组织里，象线虫，我们把那种容易恢复的表型称为无效表型。

（突变分析不是基于特定种类的等位基因——象那些成活必需，无效则致死的基因）。删除通常因细胞学决定的染色体的一些断点而具有特征性。因此它们成为客观遗传学检验的基础。任何等位基因可与之进行比较，这就为所有序列特征提供了一个标准，而不必完全依靠特殊的表型。

无效等位基因的定义是，在补偿检测中同定点缺失在行为上没有什么不同。“行为”指同其它等位基因一起所制造的表型。如果这一缺失不暴露致死基因或其它有明显表型基因的化，一个纯和无效等位基因将会跟缺失一样给出同样的表型，并且这跟纯和缺失也没有什么区别。

$$\frac{\text{null allele}}{\text{null allele}} = \frac{\text{null allele}}{Df} = \frac{Df}{Df}$$

纯和缺失通常是致死的，因此这种特殊比较通常需要突变本身是致死的。它们的共同点是缺少任何功能基因。

还有其它中情况都会误导这中分析方法。如果你获得了一个缺陷表型的化，你可能会下结论说你的突变不是无效等位基因。因为这是有携带有无效等位基因的染色体上有第二个突变的存在，它同这一缺陷有主要的关系。奇怪的是如果一个无义等位基因的表型同带有 10% 正常基因的表型无法区分的化，则你无法区别它们。

但将产生互作蛋白的错义突变等同于缺失并不完全准确。如果这个蛋白只是一个亚基，而这一亚基的存在有时能破坏整个多体——这种情况缺失是不会发生的。因此，一个突变特征主要是依赖与蛋白本身及蛋白间的相互作用。

亚效等位基因

造成功能部分缺失的突变称为亚等位基因，在分子水平上，通常表现为基因以较低水平表达或产物活性降低。它可发生在转录水平上，象转座成分的插入经常会降低转录；它也可以发生在蛋白质水平，其作用效果类似于错义突变或无义突变，它们都会降低蛋白质的活性。

亚等位基因通过增加拷贝数制造一系列等级的表型。也就是说纯和状态没有半合子状态严重，而且半合子状态也没有无效等位基因严重，顺序是：

$$\frac{\textit{hypomorph}}{\textit{hypomorph}} > \frac{\textit{hypomorph}}{\textit{Df}} > \frac{\textit{Df}}{\textit{Df}}$$

or

$$\frac{\textit{hypomorph}}{\textit{hypomorph}} > \frac{\textit{hypomorph}}{\textit{null}} > \frac{\textit{null}}{\textit{null}}$$

这分别相当于 2, 1, 0 剂量的等位基因。在一些情况下，构建包含等位基因的复本是不可能的，那些带有 3-4 份亚等位基因的构建果蝇会以额外的剂量来增强表型的挽回。这可以通过带有 P 因子的等位基因来做。

在大多数情况下，亚等位基因的突变所制造的表型与无效等位基因只是在程度上有所不同。最简单和最快的例子是眼色突变，一个很有趣的近代实验是 Toll maternal-effect 位点。在这里无效等位基因导致一个完全远轴胚胎，而不同亚等位基因制造一系列不完全远轴胚胎。有时亚等位基因的表型和无效等位基因的表型完全不同，但不同的基因表达仍造成表型上的分层分级，特别是存在从一种表型向另一种表型转变时的“门槛效应”时。

温度敏感型突变常为亚效等位突变。NorpA的一个热敏等位基因便是一例。在一定温度限制下，NorpA^{H52}突变使眼中无电活性。在一定的容许温度下，细胞内记录可以检测到电活动，但本应同步的电位却扩展为较宽的时间带。这表明基因产物参与了即时光转导，而不是最初的光吸收或最后的通道开放。此时有部分功能的等位基因比无效基因更能说明问题，但把无效突变设为基准是永远有必要的。温敏的等位基因总是很少的，所以有必要分离一系列的等位基因来。

一个温度敏感型亚等位基因不总是意味这由于错义突变而导致蛋白的结构发生变化。要看蛋白的正常稳定性和它化学剂量的需要，降低转录水平能制造出稳定敏感的表型。钠通道基因para说明了这一原理。最早的热敏等位基因证明是亚等位基因，它不过是条件性的抑制电子传导。以同样的方式一个插入突变也能是热敏的，象bithorax等位基因bx^{34e}。温敏无效等位基因也存在。这些更适于指温敏的表型，而不是温敏的等位基因。

生殖系转化子常常产生亚等位基因表型，由于很难正常充分表达许多克隆和再导入基因，亚基因总的来说是由于缺乏特殊的顺式作用元件，从而导致缩减转录效率或丢失表达区。缺失这样的序列也会使插入变得对位置效应更敏感——周围序列及控制元件的影响。许多控制生物周期的周期位置转化子，产生一个长日表型，即有一个自由运行的生理节奏是27小时而不再是24小时。这些类似于杂合缺失，通过标准突变分析分离，并在缺失测试中显示的蛋白等位基因就是亚等位基因。

§5.1.4 超等位基因

产生过多正常基因产物及功能超活蛋白的突变，我们称之为超等位基因。这种突变分子表型和亚等位基因相反。转录或错义突变可能增加蛋白功能效率。

超等位基因剂量检测显示，它通过替代缺失杂合子或无效等位基因能被纠正，至少能改善。其表型严重程度顺序是这样的：

$$\frac{\textit{hypermorph}}{\textit{hypermorph}} > \frac{\textit{hypermorph}}{+} > \frac{\textit{hypermorph}}{\textit{Df}}$$

在超等位基因不严重的地方，表型有时接近于野生型位点的复制。Notch位点复合等位基因就是这种情况。Co和N⁺的复本相似，产生厚翅脉络。而Co/Df是接近野生型，Co事实上是Norch位点的复制，它被不等位杂交恢复成整倍体而得以纠正。

§5.1.5 新等位基因

制造新功能的突变被称为新等位基因。制造新功能的分子损伤的种类没有太多的连贯性。在同超等位基因的比较中我们很容易定义新等位基因，由于它们被杂合缺失替换时是不能被改善的，它们也不能意因为加入额外的野生型基因而得到挽回。它们因产生新功能而得以被区分。

新等位基因可通过一个基因的异位表达而得到——它出现在某一地方或某一时间不该有的地方。这样转录损伤通常导致染色体重排，使一个基因启动子或增强子并置。原来的 *juxtapose* 突变是一个重排，使正常发生在胸部的转录诱导在头部表达。蛋白活性的不受调控也能制造新基因，象人类癌基因和一些突变，如使 *MAP* 激酶持续有活性的 *sevenmaker* 突变，它制造出许多光受体。

新基因的互补检测是很困难的。由于当它们同缺失结合时是不可能被改善（或恶化）的。当纯和染色体带有另一突变等位基因时，是不可能看到任何效果的，但是它们对于一些表型来说通常是很重要的。因此得到无效等位基因的一个好的策略抑制显性表型。这一结果总是无效等位基因，并且很容易通过测试和其它基因的互补性来作图。

在此无效表型位点还不知道的情况下，新等位基因的反转能提供很多信息，就象上面提到的 *Antennapedia* 突变显示的那样。当用化学突变剂时，*Antennapedia* 等位基因的反转制造隐性致死等位基因。它显示一个互换的表型：腿部组织移到触角上。

对于通过反转显性而获得无义突变这一规则的一个例外，是 *Sxl* 基因，这一基因占据着性别决定的主要位置。最初的等位基因 *Sxl*^[*+*] 证实是一个无效等位基因，雌性纯和致死。然而其显性等位基因 *Sxl*^[*ms*] 却证实是持续有活性，当然对雄性是致死的。通过化学诱变剂获得反转显性产生几个新等位基因，它们的特性对于使 *Sxl* 有意义是很关键的。这些等位基因，隐性但并不是无效，瓦解了 *Sxl* 从维持细胞的自控功能到开始雌性发育所扮演的功能。

§5.1.6 反效等位基因

杂合子情况下纯和子表现更严重的突变表型

反效等位基因事实上是中和野生型等位基因的突变，它有别于新等位基因。由于它能通过额外剂量的野生型基因回复，或部分回复。以前提到的有毒性亚基，作为无效等位基因和缺失间的一个例外，就属于这种情况。*成为哑巴总比变成疯子好*

有些Norch位点Ax等位基因就是反效等位基因。在这里纯和子是可存活的，杂合等位基因是致死的。Ax制造短翅脉，短而薄的翅膀，浓密刚毛的表型。对于一些等位基因，Ax/Df的缺陷是可以被纠正的，但并不很接近于额外剂量的N⁺。Norch蛋白被认为是作为信号转导的细胞受体，并且Ax突变好象连续有活性，我们不希望额外野生蛋白起这种作用。

§5.1.7 功能的缺失与获得

不是所有的基因都能突变成所有可能的等位基因。有些将不再产生明显的功能获得表型，而另一些将不再产生明显的功能缺失表型。这都依赖于基因产物的模式和作用位点。

多拷贝基因的存在只有在功能获得突变体才能发现，这可能是唯一的分离方法。这些超或新等位基因恢复时会导致不显著的“无表型”表型，由于它们被其同源物很好的缓冲了一下。

相反的在许多果蝇的眼色基因中，它们中许多是色素合成和沉积酶，很少有突变成功能获得表型的情况。

功能获得型基因常常显示与功能缺失等位基因互换的表型。在这种情况下，常常意味着基因产物有调控作用。这些基因产物的分子本质可以是一些受体类蛋白象 torso 或 Norch，也可以是一类转录因子类蛋白象 Antennapedia，还可以是分裂因子类蛋白象伴性致死。

§5.1.8 基因内相互作用

回到 Cambrian 的前分子遗传学时代，人们更多的是关注互补的反常方式，它们可能对基因本质是一条重要线索。这些所谓的“复合位点”是由于在等位基因联合会中特征性的互补而得名：例如 m1/m2 和 m2/m3 无法互补，但 m1/m3 却可以。这其中的三个 the bithorax、Norch 和 rudimentary 被研究的很细，包括正确结构和重绘作图。这些研究成功的把一些突变表型归结到特殊的基因区，然而在一些情况中显示互补等位基因通过联合会是可分的。这一明显的矛盾，在那个认为基因是结构功能单元的年代是无法理解的。只是说伪等位基因主义而没有提供对现象的解释。克隆这些位点并鉴定它们的基因产物显示它们都是都是单独而且巨大的转录单元——尽管证明 bithorax 复合体是可靠的复合体，并且包括两个邻近单元。这个互补复合体形式是由于单元和蛋白内可分的功能造成的。

在遗传分析前克隆时期，否定互补是另一种异常而又令人迷惑的情况。在杂合等位突变联合的例子中，它产生了一个更严重的表型：例如 m1/m2 比

m1/m1 或 m2/m2 更糟糕。这种行为是通过 Norch 突变等位基因观察到的并导致了亚结构间的互相作用。

§5.2 互相作用的等位位点

所有基因分析的例子适合于同一位点不同等位基因间的相互作用。在双突变体测试中来决定两个基因或基因产物间是否有相互作用。在早期微生物遗传学，双突变体的构建和检测是一项真正的技术。用最简单的方式，在两个位点构建一个个体突变，并且分别比较每一突变体的表型和双突变的差别。用这种方法发现的相互作用的本质是不同的——从直接的蛋白产物间的物理接触到非直接对平常末端的作用。由于这一原因，这种相互必须被详细的阐明，等位基因特性（在某些等位基因间很明显的地方发生那些相互作用）是证实相互作用直接性的一种方式。

§5.2.1 在一条通路上的有序基因

通路分析如今是一个受欢迎的方法，用来描述那些涉及到发育的基因功能，这一范例（一套基因产物执行代谢前体的顺序转化）是经典的生化过程。从用 *Neurospora* 生化突变体产生了“一基因一酶”假说，代谢途径在关于基因本质的理论史上扮演着中心角色。

随着信号转导，第二信使及它们的膜和胞质组分研究的进展，这一通路分析呈现了一个新的前景。生长因子、酪氨酸激酶受体和它们胞内靶位点间的相互作用，通常根据生化通路来进行描述，并且通过遗传学方法来发现这种组分与发育过程上的联系。影响同一发育事件间的突变的相互作用，使将每一突变所定义的步骤进行排序成为可能——首先在线虫 *Caenorhabditis elegans* 然后在果蝇。

最直接的检测是检查同一通路不同基因中功能获得和功能丧失间突变体的相互作用。如果一个激酶只有通过其它基因产物激活才能获得功能，然后这个激酶的一个功能获得性突变被释放到其需要的地方，并且持续有活性，则基因的功能缺失突变在激酶之前发生作用对这一连续激活无影响，激酶突变是上位 (epistatic)。另一方面，功能缺失连续作用于激酶，通过阻止信号无法到达路径的末端会阻止功能获得型表型。这些对激酶突变是上位的。

这种相互作用的行为的例子可从细胞命运决定研究的光受体 R7 及在建立最终胚胎形式系统中获得。在许多情况下，相互作用位点的发现来自于对抑制子和增强子的分析。这些名字指是否一个新分离突变改善以前分离突变的表型，或者它是否使原来的表型增强。另一个例子我们发现相互作用只是通过在影响最终表型或过程的不同位点间做成双突变体。

如果分析的是显性突变的化，分析抑制子或增强子是很简单的。因为它们显性，因此使在 F1 代出现的新突变很容易发现和繁殖。当作图时，例如在 *sevenless* 通路上找到一个连续 MAP 激酶，它的分析就是以 *boss* 突变体而开始的（*sevenless* 的桥梁在胞外激活 *sevenless* 通路的胞外配体）。

Mutagenized ♂♂ *w¹¹⁸, boss³⁹⁹¹* × *w¹¹⁸, boss³⁹⁹¹* ♀♀

我们分析检测在 R7 光受体存在下的行为，最终导致的突变体 *sevenmaker* 证明是 *rolled* 位点的一个等位基因，并且接下来被发现编码一个 MAP 激酶。既然它们的突变筛选需要活体，因此得到一个成活 *rl* 等位基因，其无效等位基因是致死的。隐性增强子或抑制子的分析更困难，由于它们需要突变在启动时就以纯和子的形式存在。

§5.2.2 剂量依赖的相互作用

鉴定互作位点是一个好方法，它可以用来定义一些对生化过程起作用的额外因素，因此比途径分析有更多的应用性。途径分析尽管很有价值，但却无法合并许多基因互作的非线性本质。另一方面基因互作发生在各种情况下，因此必须提供一个方法来研究其特殊机制，否则它将很难驾驭。

反式调控基因适合于上述情况，必须形成复合体或是与其它因子竞争其 DNA 位点，这一过程可能对剂量敏感（被定义为野生型位点拷贝数的改变）。如果剂量改变引起非显性表型改变，那么通过限制这些位点同第一个位点相互作用，常常能使果蝇对其它位点的剂量改变很敏感。

Botas 等人用这一方法鉴定 *emc* 位点，依据它同 AS-C 基因间相互作用。几年后我们发现这 *emc* 蛋白抑制 AS-C 复合体结合到特定 DNA 位点上，*emc* 的存在是通过带有额外野生型剂量 AS-C 的杂交所发现的（插入到包含有位点 *Dp(1;2)sc¹⁹* 的 X 染色体区的第二染色体内），并且分析带额外刚毛的后代而发现的。这一想法就是额外 AS-C 基因将破坏系统的平衡。使它对互作基因产物量上的改变很敏感。这一策略是：新 *emc* 突变影响正常的遗传背景且是隐性的，而由于额外的 AS-C 拷贝的存在，它则称为显性。杂交是这样的：

Mutagenized males $\frac{y}{Y'} \cdot \frac{Dp(1;2) sc^{19}}{Dp(1;2) sc^{19}} \times \frac{y}{y'} \cdot \frac{Dp(1;2) sc^{19}}{SM5}; \frac{TM1}{TM2}$

这一方法的意义在于任何新的常染色体突变在 F1 代是自动平衡的，同时在 F1 代显示任何显性表型。

§5.3 条件等位基因

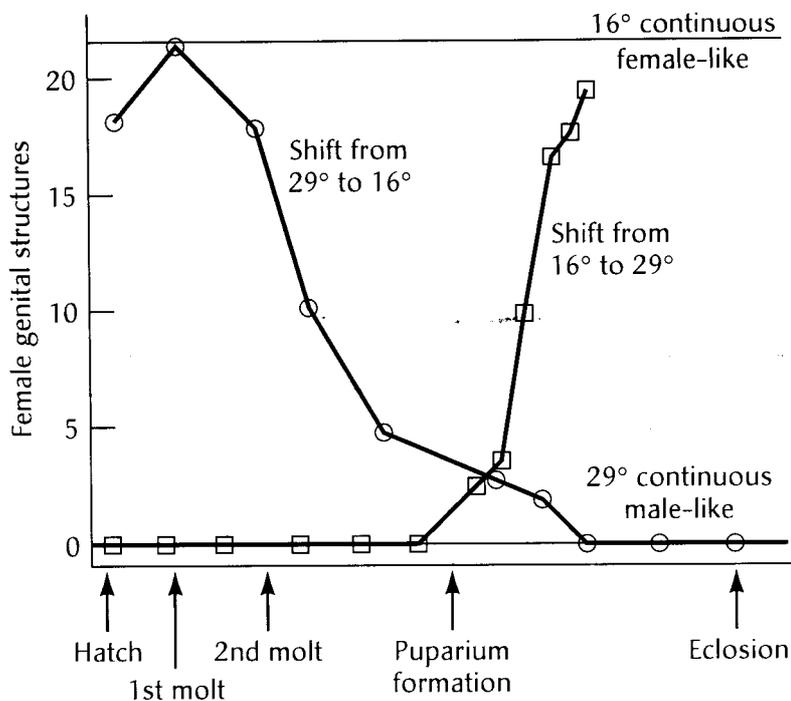
如今我们喜欢的许多果蝇遗传学工具其起源都要追溯到过去，在那个年代认为基因的本质是基本的问题。重组作图起源于 Muller 对等位基因的分类，即使是突变体也是为这一目的服务的。条件突变也有着同样的历史，它的出现是想集中研究并证明 40 年代提出的“一基因一酶”假说，并且成为微生物遗传学的核心。在 60 年代末，David Suzuki 带来了果蝇技术并一时使分离各种温度突变体成为研究的热点。

对温度敏感是几种条件突变体中最常见的，并且对热的敏感明显强于对冷的敏感。这种突变体常常是由于氨基酸替换，尽管它们有时也能通过条件化转录插入而得到（温度敏感等位基因必须同因不耐热而抑制转录水平的突变体区分开。因此上面情况对钠离子通道位点 *para* 而言，是通过膜上钠离子通道的数目变化而制造了热诱导的功能丧失——激活钠钾通道开放）。另一个从异种多体中移去一个亚基也能产生耐热表型。在这种情况下，象 *csp* 突变体中看到的，突变可能是无效等位基因，并且仍制造热敏表型。

条件化等位基因是一个重要的发育工具，因为它们对基因功能提供了一个时间上的调控。这对于那些被多次用到和多功能的基因尤为重要——这一特征很常见。依靠突变的“漏洞”，它可能完全开放或完全关闭基因，通过在果蝇生命周期中任一时刻从一个孵卵器中移到另一个孵卵器。对于致死突变而言，这一方法（基因的活动在后来的生命周期中而不是在通常的致死阶段）能被检测到。这就象在温度敏感 *Norch* 等位基因中所做的一样。即使致死不是附带的现象，后来的表型也会是它被一个更显著的早期基因所遮住，就象在研究了温度敏感跳跃等位基因 *eve*^{ID19} 在表皮分裂中的作用后，来研究基因的在神经线中的功能一样。

对于行为突变体区分对发育的影响和对生物物理上的影响是很重要的，条件化等位基因允许基因产物羽化后的废除，就象神经传递突变体 *choline acetyltransferase* 一样。因为它们是如此有用，因此检查新突变的温度敏感性是很明确的。即使当一个突变分析不是专门被用来产生条件化等位基因，有时它也会象上面提到的 *eve*^{ID19} 那样而用来产生条件化等位基因。

温度敏感等位基因也会对特殊表型的关键时期产生限制。对于那些在整个生命周期都表达的基因，象性别决定基因中所涉及到的，这就不容易确定了（尽管有减数分裂技术可给出一定的信息，在六章中讨论）。限定一个温度敏感周期的方法是：建立一系列不同时间品系，一半给热量，一半限制热量——在生命周期中有规则的中断给热，或是从一个温度变到另一个温度——最后计算突变或野生型个体的年龄。每一套都产生一曲线，且彼此间交互。在沿平稳时期下降的一点我们定义为 *T_{sp}* 的边界，交叉点我们视之为中点。如图 1：



有些基因对温度敏感等位基因诱导是耐受的，可能是由于额外的热稳定产物。当这发生在同构复合物上时，额外的基因型有时也能通过适当的等位基因的联合而合成。只有以这种方式，才能在 *Ace* 获得热敏基因型。作为主要规律，如果在高温分析突变体，大约 10% 在一个位点恢复的突变体在低温下将正常。

冷敏突变体尽管很少见，但也能从突变分析中获得。它们同样能定义 Tsp 并开或关基因。它们的优势是：热较冷更易使野生型分解，尤其是在一些行为分析上。它们也提供了不平常的表型，象在 *acetylcholinesterase* 基因 *Ace^{j29}* 的冷敏等位基因那样。由于条件化致死它区别与所有的热敏基因型，但是即使是限定的温度，它依然是有活性的。

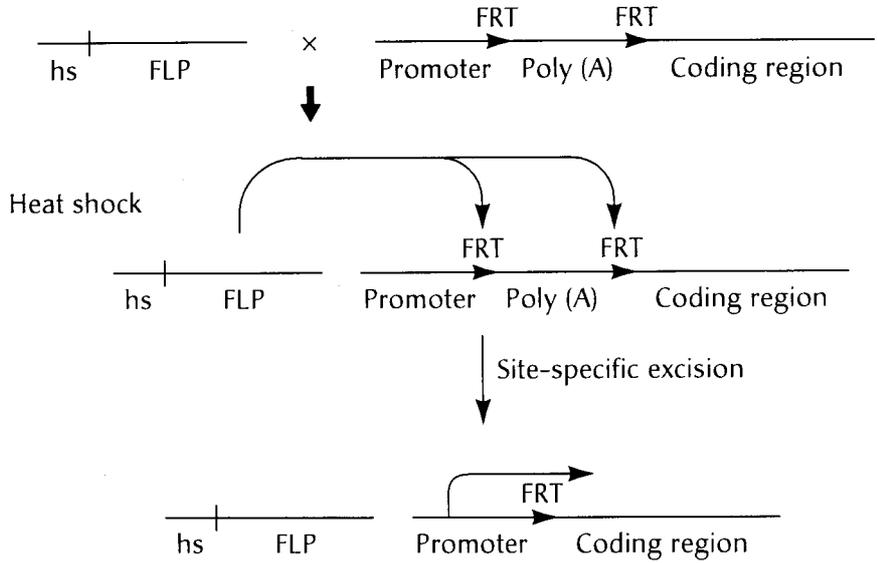
§5.3.1 可诱导启动子

由于热激启动子驱动的转基因的应用，它和条件化等位基因都允许对基因表达进行时间上的调控。热激有着很好的把目标限定到一种现象的优势。由于

转基因是被诱导的，诱导参数、持续和破坏都可很精确的决定。但是它由于不能持续表达，且只能开而不能关闭基因，因而其应用是很有限的。

稳定的诱导使由酵母导入 FRT 体系成为可能。这一技术涉及到一个位点的特异切除，这是由一个在热激蛋白控制下的酶来进行的，它作用于靶序列来促进转基因的表达。这是通过用 PolyA 来实现的。

在 PolyA 两侧与 FRT 相连，然后转入所需基因克隆中再把它导入胚胎来得到母系转化子。这些果蝇将直到 FLP 酶在那些细胞中表达并发挥 FRT 侧抑制作用，才表达那些被抑制的基因。为了达到这一目的，我们只须将 Hs-FLP



和 FRT 阻抑基因进行杂交。FLP-FRT 系统的优势是一旦基因有活性，它就有活性。

在最初的研究当中，野生型白眼基因被切除（这是 white 基因的精髓），从而在 w 位点发生突变。在 37°C 或 38°C 蛹将被刺激 60 或 80 分钟，当到了成虫，所有的个体都显示一些白眼组织。热刺激越晚在眼中发生切除的比例越小。在眼盘细胞停止分裂后，就不再会有诱导发生。通常认为这是需要分离完全切除的结果。在非热激兄妹中，8% 显示出一些白眼组织，可能由于非诱导的 Hs-FLP 的低水平表达。

§5.4 突变表型的维持

突变是被定义为一个基因的稳定变化，这一如何维持突变表型的问题看起来很傻。但突变表型经过一段时间丧失表型确实是遗传学上的一个问题。这一问题当突变是以纯和子存在时就更为明显。还有来自群落不同变种的选择压

力，无论多微小，还有可能是不可视的，它都会对你想要维持的突变产生影响。极端一点突变表型就会都失去。果蝇行话“修饰的积累”——这样的描述使之听起来好象我们知道发生了什么（对突变表型缺失更详细的解释是品系的污染，如果你保存在带有明显隐性标记的染色体上的突变，那么你能立即说出这个问题的原因）。

杂交是一个标准的强表型恢复方法，由于不做修饰后的处理。这种杂交是将带有突变的果蝇同带有那个染色体平衡子的果蝇交配，挑出杂合雄蝇和雌蝇，然后再使其交配成纯和的突变体。这一方法很有效，如果修饰和突变不在同一染色体上。如果这些修饰是相关的，那么让带有突变染色体同野生型染色体自由重组，然后再重分离突变则是很必要的——象在第二章描述的削减突变染色体。

这一问题有时也能通过使存储的果蝇杂合而很容易的避免，但是如果突变是可成活的，则需要一些努力，那样你将需要每一代都选出杂合平衡的子代。

第六章 突变分析:嵌和体

高等生物的多细胞性带来了一大堆病毒和细菌遗传学家所未曾遇到过的问题：不同细胞中分化基因表达的突变分析有何结果？基因在哪里活动？突变表型是由细胞突变直接导致还是由此突变细胞通过胞间作用而间接导致的？诸如此类的问题在发育和行为学研究中显得尤为突出。而解释这些问题的遗传学途径，便是嵌和体分析。

嵌和现象发生在正常有丝分裂遗传物质不被同等分配到子细胞时，结果是一个个体其细胞的基因型不尽相同。如果这些细胞可以分做两类，突变型和野生型，那么我们就有可能回答上面所陈述的问题了。而且嵌和体还可用于分析细胞谱系和致死突变在生命周期的后来阶段的活动情况。

染色体缺失

X 染色体的诱导丢失是果蝇嵌和体分析中常用的手段，它最初是从 Alfred Sturtevant 对 claret 突变的研究开始的。由于染色体丢失造成异倍体，故只可能在雌蝇中获得成活的嵌和体。或者是雄蝇中丢失标记的 Y 染色体，或者是丢失第 4 染色体。雌性配子中 X 的丢失导致雌雄嵌和体的形成——一部分雌性部分雄性，只要丢失事件在发育过程中发生的足够早，就能有极高的成活率。因为这样 XO 细胞就不会因为缺少剂量补偿效应而出现致死现象。而丢失第 4 染色体则果蝇仍能存活，因为它很小，尽管单倍第 4 染色体果蝇有 Minute 突变性状。

染色体缺失嵌和体的应用

染色体丢失是获得大量嵌和体和配子基因表达前获得早期克隆的一种可选的方法。

命运作图

最初嵌和体技术是用来进行果蝇胚胎命运作图的，Sturtevant 运用和确定染色体上基因间的重组距离的同样原理来确定囊胚上原始细胞间的距离：分裂线落在两个结构间的嵌和体越多，它们相距就越远。这里假定嵌和体分裂线以随机的取向“分开囊胚”，若两个结构从未表现出不同的标识基因型，则它们必定来自囊胚上同一个前体细胞。这一思想最初在 *Drosophila simulans* 中发展，后来又为 Garcia-Bellido 和 Merriam 扩展并应用于 *Drosophila melanogaster*，先是成虫的甲壳，然后是成虫的内部组织和幼虫组织。

命运图谱是通过确定在每一结构中是否有标志的出现，然后对这些距离进行三角作图而获得的。结构按比例得到的命运图谱跟 Poulson 用胚胎切分的组织学方法获得的图谱惊人的相似。随后用热针尖除去囊胚上的细胞的方法，这一结果得到进一步证实。

在更局部的水平，同一结果内细胞间的偶联关系也可确定，例如在复眼的小眼中，整个小眼，甚至 8 个光感受细胞都不是由同一前体而来，这种连锁关系更多的是用有丝分裂重组来研究的

Focus of Gene Action

染色体丢失造成的嵌合体分裂线的随机性，以及丢失事件先于配子基因表达的事实，使得它对于估量发育突变的细胞载体是个理想方法。也就是说鉴定哪些细胞的突变是造成突变表型所必须的，由此可以推断出哪些细胞必须正常表达野生型基因以发挥正常的发育功能。

这一技术曾经用来制造体节基因 *runt* 突变的嵌合体，以及细胞命运决定基因 *Norch*、*sevenless*、*bridge of sevenless* 突变的嵌合体。在上述情况中，可以确定突变自控区，其中细胞的基因突变直接导致突变表型。

雌雄嵌合体在行为的遗传学研究中起过中心作用。通常细胞群范围尺寸较大而且较集中，故而在某一区域定有相应数目的神经元同时受影响。尤其是它们作为雌雄两种细胞的混合体，使得它们很适合于确定决定性别特定行为的脑区。这一分析方法大体上就是统计某一脑结构为雄性或雌性与果蝇的雄性或雌性相偶联的次数。还有另一个正式的成分，它最初从 *Sturtevant* 的命运作图引申出来，而被用来在你不知道该研究哪一块，或者是研究区牵涉到神经系统的很大一部分时确定细胞区域。对于影响神经元功能的生理突变，嵌合体提供了研究特定区域阻断的行为学效应的新方法。由于这些突变多为胚胎期致死的，雌雄嵌合体却可以在脑区突变的情况下活到成虫期，就象乙酰胆碱酯酶突变的嵌合体一样。

诱导染色体缺失的方法

相当数量的影响有丝分裂和减数分裂的突变体能够产生遗传嵌合体。这是当初 *Sturtevant* 研究 *Drosophila simulans* 突变的出发点。这些突变的效应不只限于某一染色体，嵌合体后代的比例也相当低。另一个常用的基本技术是利用不稳定存在的环形 X 染色体 $R(1)W^{vc}$ ，这种重组染色体很容易在有丝分裂早期丢失。

环形缺失

不稳定环形 X 只要适用，它就必定是大家乐于选择的一种方法，因为其嵌和体后代的比例相对较高，而且这种品系比较易于构建。但它也有个局限性就在于只能造成 X 连锁基因的嵌和体，因为很难将常染色体位点转置到 X 染色体上，尽管这并非完全不可能。标记基因也必须是 X 连锁的。

在雌性不稳定环 X 和 y,w 突变的 X 染色体上，在甲壳和眼睛中很容易观察到嵌和现象。这是由于胚胎分裂早期环 X 丢失和随后单倍 X 细胞扩增的结果：

$$\frac{y w}{Y} \times \frac{R(1)w^{vC}}{\ln(1)dl-49, y w lz}$$

↓

$$\frac{y w}{R(1)w^{vC}} / \frac{y w}{O}$$

环 X 最好是从母代获得，因为它在准杂合的雄蝇中较难保存。如果环 X 在品系中积累数代保存率都很高，那么环 X 已不再是不稳易丢失的了，这个品系也就不再有用。

通过选择雌雄嵌和体来保持品系似乎较困难，因为这些果蝇可能具有两性。最好的方法是收集所有的嵌和体果蝇，至少其中的某些果蝇是可育的。在好的情况下，20%的潜在嵌和体能产生嵌和体后代。嵌和区一般占总量的50%，但若丢失则小于50%，数次丢失则大于50%。

Harris等人用环形染色体缺失的雌雄嵌和体证明sevenless突变是作用于视网膜的R7细胞从而产生的突变表型。也就是说sev突变表型，缺少R7是自主的。由于sev是X连锁的，环形染色体上有其一个野生型等位基因。通过把眼色突变w重组到sev同一染色体上，利用w突变缺少眼色素这一点，则丢失环X的细胞必然是w和sev同时双突变的。结果他们发现所有有R7细胞的嵌和体部分，比有眼色素，而从来没有sev⁻R7。

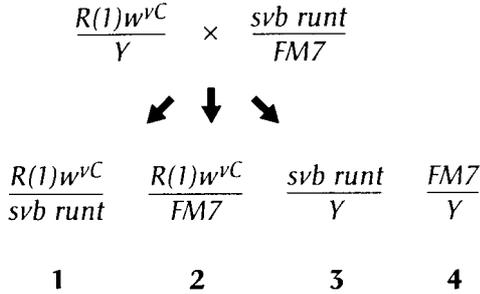
后来Reinke和Zipursky用同样的方法证明bridge of sevenless boss突变，它也造成R7的消失，是非R7自主的。它作用于R8，因为发现了许多boss⁻R7细胞被回复过来，而当小眼中有boss⁻R8细胞时，就没有R7细胞。

环形染色体技术在胚胎的研究中是很常用的。嵌和发生的频率是很重要的，因为尽管较容易识别出那些少见的带有小的黄色 y 甲壳区的嵌和体成虫，要挑出这些少见的嵌和体胚胎却是几乎不可能的。Gergen 和 Wieschaus 用 X 染色体上的小牙齿标记来研究胚胎表皮中 X 连锁的色素突变体的细胞自性。

他们将 *svb* 和色素突变 *runt*、*armasillo*、*fused giant* 和 *unpaired* 分别组合到同一条染色体上融合启动子，如 *armadillo-LacZ* 和泛肽-GEP 亦可作为有效的嵌和体标记。

有时所研究的基因本身就可育作为标记。Hoppe 和 Greenspan 用 X 连锁的 *Norch* 基因的蛋白产物的抗体作为 *Norch* 嵌和体胚胎的成神经细胞的标记。乙酰胆碱酶的组化方法也可用于显示 *Ace* 突变的嵌和体

杂交产生环形染色体丢失的嵌和体胚胎的操作方法跟得到嵌和体成虫的方法有所不同。如果有些非嵌和体后代能容易识别就能帮上忙了，因为你不必再费心的去在本已很小的胚胎中寻找更小的嵌和区了，而有些胚胎可能根本就不是嵌和的。要实现这一点，环 X 就应该从父亲导入，而要显现的突变则应该从母亲处获得。结果仍然是只有 1/4 的果蝇可能成为嵌和体，但这里多了一个准杂合后代——它从母亲后代突变基因从父亲获得 Y。



第一类是潜在的嵌和体，而第三类则将全部是突变，故可识别。从理论上第三类同第一类卵数应一样，故可作为第一类嵌和体的分母。而且第三类的胚胎不必费神去寻找嵌和区。当然肯定有几乎全部突变的嵌和体，但是通常无关大局。

常染色体基因嵌和体

X 染色体当然有很多基因，可是更多基因则是在第二染色体和第三染色体上，而很不幸的是这些染色体若在有丝分裂时丢失则是很早就致死的。为了解决这一问题，Lewis 指出只要你能将你的基因的野生型位点移到 X 上，你仍可通过 X 的丢失来获得此基因的嵌和体。只要这个常染色体位点在嵌和体中仍能表现出突变性状，这个方法还是相当不错的。

Lewis 的方法是这样的，他将 *Bithorax* 复合物转座到 X，得到 T(1 ;3)O5，然后把他通过双交换，转到环 X 上。于是获得有 BX-C⁺ 的环 X。(此环 X 不是那条不稳定的环，而是一个可稳定存在但又可能被诱导而丢失的环形 X 染色体。可

他用 的这种技术不可靠因此简直就不值得一提) 然后他做下面的杂交来看是否bithorax是细胞自主的方法得到homeotic transformation:

$$\frac{R(1;3) \ O5}{Y}; \frac{bx}{bx} \times \frac{y}{y}; \frac{bx}{bx}$$

后代中所有果蝇都是bx纯和的, 所有雌蝇都是潜在的嵌合体, 是环X 和y杂合的。结果是转化果蝇甲壳均为y而反之则为y⁺, 表明了细胞自主性的存在。

(好吧我来讲讲他是怎么做的: 把很老的雌蝇和很年幼的相对稳定环X的雄蝇交配, 这种方法除了他自己没人能重复出来)

可是有时也可以直接将常染色体位置转置到环X In(1)W^{ve}, Gailey采用一条携带有多巴氨脱羧酶正常基因插入的P因子的X染色体与环X染色体双交换杂交。其实从原理讲P因子可以直接插入到环X中而且也可以分析其插入位置。但是难处就在于环X上的W^{ve}使得w⁺ 或ry⁺等不再适合于标记P因子的插入。而且就一般方法而论, 还有一个难处就在于将基因转座到环X染色体以后存活率降低。要从单只果蝇里找出这么条染色体来并由之而扩增出一个品系来不是件容易的事。

一个常用且可行的来获得常染色体位点转置或转座到 染色体 X 上的雌雄嵌合体的方法是使用可使染色体变得不稳定的突变。有三个此类突变曾被成功应用, 而其中 paternal-loss 和 claret-non-disjunctional 已知是编码有丝分裂器的成分的。

较早分离出的 pal 使父方获得的染色体不稳定。它是极少的父方效应的果蝇突变之一。雄性 pal/pal 的后代可以是对它遗传下去的任何一条染色体嵌和的。若是第 2、3 染色体丢失则胚胎会死亡。若后代中雌性配子失去了从父亲处继承来的 X, 她将成为雌雄嵌合体, 若第 4 染色体丢失, 果蝇将存活并在单倍体组织中有 Minute 表型。故携带有野生型常染色体位点的 X 必须是从 pal 纯和的父亲处获得的:

$$\frac{X-Acph^+}{Y}; \frac{pal}{pal}; \frac{Acph^n}{Acph^n} \times \frac{y}{y}; \frac{Acph^n}{Acph^n}$$

↓

$$\frac{X-Acph^+}{y}; \frac{pal}{+}; \frac{Acph^n}{Acph^n} \ / \ \frac{X-Acph^+}{0}; \frac{pal}{+}; \frac{Acph^n}{Acph^n}$$

Acph是酸性磷酸酶的结构基因, Acphⁿ为其无效等位基因。X-Acphⁿ 野生型位点被转置于X上。获得此雄蝇的方法见第四章。

pal 的染色体丢失率为 1-5%，而且果蝇品系的保存不必经常挑。嵌和区的大小一般占总量的 30%-40%。而对 Y 的丢失 pal 的效率会比一般情况降低 9 成，对 Y 中心粒重排也是一样。如果你想通过使连体 X 和 T(Y ; A) 的方法获得 X 染色体上的常染色体重复，那这一点可能会有影响。有时这种交换事件的发生会导致获得 Y 中心粒，而 pal 会有不利影响。

Cand是Sturtevant在Drosophila simulans中发现的那个基因在D.melansberg的同源物。它实际是两个单独的基因，一个影响眼色素，另一个编码纺锤体中的类肌动素成分。与pal不同此处母系染色体不稳定。故携带染色体野生型位点的X染色体应由母系处导入。

Drosophila simulans 突变曾用于早期命运决定作图和谱系跟踪研究，尽管后代中嵌和率大小达 20%，嵌和区大小达 50%，但亲代纯和的雌蝇由于减数分裂严重受损，其生殖能力相当差。结果，几乎没能获得多少嵌和体。

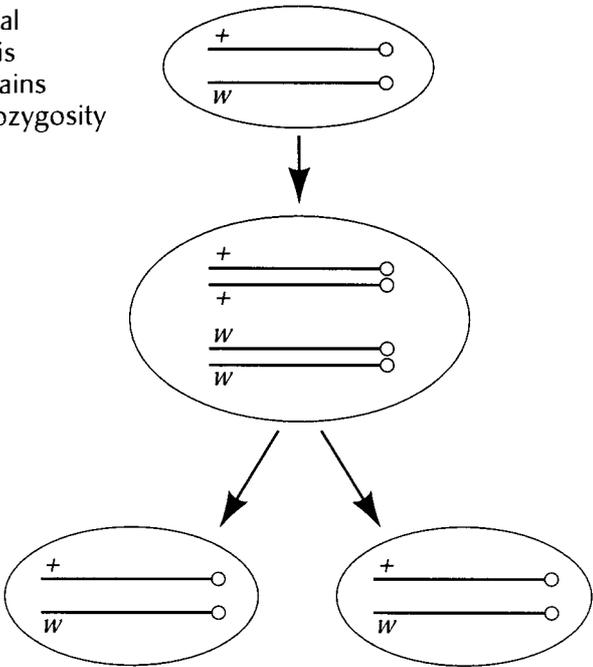
嵌和体品系的保存

大部分使染色体的突变它们本身也不稳定。环X若仅仅是简单的往后传代将丧失造成嵌和体的能力。pal和Cand问题少些。要保持环X品系的不稳定性，有必要不断挑选，并用In(1)dl-49, ywlz来平衡In(1)W^{vc}，因为每一代的甲壳和眼色的嵌和体较容易识别。（此平衡子在雌蝇中可存活而在雄蝇中为纯和不育的，故可以保证它不与环X同时被丢失）。你可选出雌雄嵌和体中有雌性生殖器官的，并把它们当作雌蝇而由之建立一个品系。极好的环X品系中有 30%的嵌和率，差的可能低于 5%。这时就该采取些补救措施了。相反pal果蝇就那么在纯和态放上 10 年，它产生嵌和体的能力也不会降低。pal 对于存活率是没有影响的，你可以最终获得同环X一样多的嵌和体，Cand尽管必须平衡以防止消退效应，也不会随时间而降低效力。

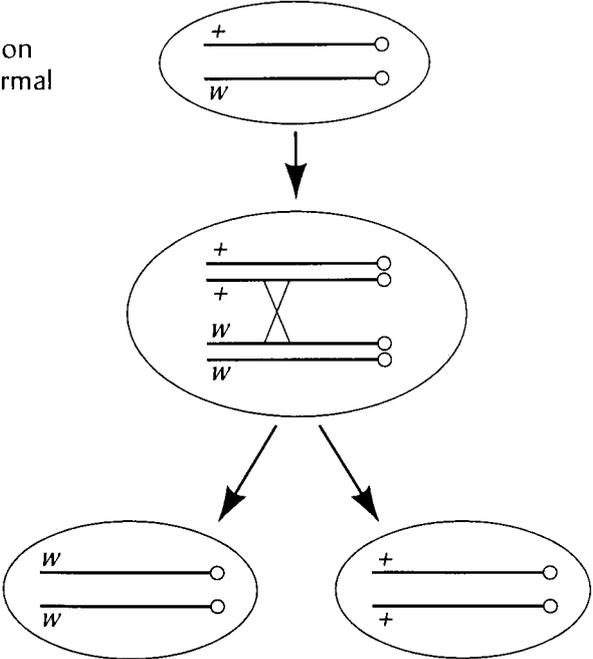
有丝分裂重组

野生型或显性等位基因的丢失也可通过杂合的同源染色体在有丝分裂期间发生重组而获得。在体细胞中这种重组自然发生的频率较低，但也可用放射或其它的技术诱导获得。这里在一个对 *w* 突变而言杂合的细胞中，其分裂后子细胞一个是纯和野生型而另一个则是纯和的突变基因：

Normal mitosis maintains heterozygosity



Mitotic recombination subverts normal mitosis



纯和野生型细胞从表型上跟别的细胞是分不清的，可是纯和突变细胞在眼睛中则是白色的。这些 w/w 细胞将现出白色表型并形成一一个群落。如果另一个隐性标记基因反式的存在于 w 染色体的同源染色体上，则有丝分裂重组所产生的两种纯和后代细胞都可以标识上。故而对双杂合果蝇 w(1-1.5)/rst(1-2.2)的放射处理可产生孪生点。要么是白色小眼，要么是粗糙小眼。这种孪生点对于品系跟踪是有用的。

这种事件是完全随机的，在果蝇的任何分裂期间都有可能发生。发生重组的细胞克隆系能否检测到，就取决于此基因能否影响此分裂细胞及其后代的表型。如果 w 突变在刚毛前体细胞纯和，你是观察不出来的。有必要将检测重组发生的标识基因和所要研究的基因分别开来。

标志突变基因应该是细胞自主作用的，而且不影响发育和行为过程。你能否检测到标志基因所显示的嵌和区，取决于那个基因在发生有丝分裂重组的细胞类型中是否有表达。标志基因还应当跟所要研究的那个基因挨得够近且靠近着丝粒。所研究的那个突变能否在嵌和体中产生突变表型有赖于两个标准：有丝分裂重组是否在恰当的地点发生，发生的时间是否足够早，从而造成不同的表型。“恰当的地点”指此突变区细胞的前体细胞，而足够早指的是基因表达的关键时期。

发育的时间对于这一技术相当重要。一些关于胚胎中细胞谱系控制的重要发现就是靠很小心地控制诱导时间才获得的。所以这些子代的年龄必须尽可能准确的搞清楚。细胞的同步化是通过收集在很短时间间隔内所产生的新鲜卵而实现的。不断产卵期的雌蝇是一旦卵受精就排出来，故沉积时间是配子发育启动时间的一个很好的度量手段。

使之日龄一致的培养

关于如何处理果蝇使之产好卵的所谓方法简直跟果蝇其它方面的经验一样多，但归根到底就是让果蝇觉得高兴，高兴了它们才能多下卵。要使它们高兴，你得在瓶子里给好吃的，住得也不能太挤。一般是 50 只处女蝇于底部铺有上等酵母的干净瓶子里。放上 10 天左右，换个瓶子加入合适基因型的雄蝇。再放上一两天，它们就可用于收集卵了。

如果放射处理和分析是在胚胎或幼虫期进行，收集的时间应为一次一小时。若是处理期较靠后则可稍延长些，因为随着发育过程的进行将会出现异步化。收集卵可用一小片蘸了醋和酵母糊的吸水纸，铺有酵母薄层的琼脂平板或是培养瓶。具体如何选择取决于要在哪个阶段诱变，要在哪个阶段收集嵌和体。一般吸水纸对应胚胎，琼脂板对应幼虫，培养瓶则适于蛹和成虫。

头一两次收集的卵通常不好，到第三此卵将大量排出。收集到的卵培养一段时间后进行放射或热休克处理，这取决于诱导重组所采用的技术。对于蛹的同步，收集的前体蛹较为准确，看起来它们象奶色的不动的棒子，象三龄幼虫那么大，黏在瓶壁上，它们可从瓶壁上取下移到大瓶中完成化蛹和变态反应。

§6.3.2 有丝重组嵌和体的应用

有丝分裂重组是产生小群落，控制诱导时间和无损伤谱系跟踪的很好方法（也称为体细胞重组以区别于生殖细胞在减数分裂时的重组）。

这一技术最初是用于遗传学的——用来表明细胞内也可发生重组。同时它也用于解释一个早期的关于发育的问题：要产生某一突变表型必须突变哪些细胞。在 *Curl Stem* 最初的表述中，此问题是是否能区分影响“模式和前模式”的基因，这两种说法就在一定程度上和现在所说的自主和非自主相对应。

§6.3.2.1 品系分析

有丝分裂重组是仅有的无损伤研究细胞谱系的方法。因此它可用在任何发育阶段标识上一个细胞群落，不论所在的组织藏的多深。而此法成功则取决于将重组限定在前囊胚期的单个细胞中的能力。幸好放射处理是可以校准到获得较高的单克隆产率。*Lewrence*和*Green*发明了一种能保证单一标记克隆代表单一重组事件的方法，那就是去寻找同一基因内不同突变间的重组。他们采用 *w*基因的两个不同等位突变，若它们间发生有丝分裂重组，则会产生 *w*⁺后代和双突变 *w*基因的后代。而 *w*⁺型在 *w*突变背景中是很容易发现的。

谱系追踪用有丝分裂重组来研究多是在外部组织中应用，因为色素突变标记比较容易看出来。有关用杂交的方法获得隐性突变标识杂合后代的实验是早有人做过的。所获得的杂合后代正好用于诱导有丝分裂重组细胞。有丝分裂细胞可用于翅膀、眼睛、脖子和胸肌细胞的谱系关系。而这些细胞在整个结构中所占的比例则取决于诱变时有多少个前体细胞。而果蝇发育研究中的一个极重要的发现，区块便是通过加速诱变细胞的分裂而不改变其邻近区域的细胞而获得的。利用 *Minute* 突变，*M*/+诱变后获得+/+，这些细胞比旁的细胞长的快，因而在最终结构中占有比正常情况要大的比例。在这一过程中，这些细胞沿着翅膀盘的一系列边缘鼓起，而这些边缘线是沿前后和背腹轴将原肠胚分开的，也称区块。

§6.3.2.2 Focus of Gene Action

任何嵌和体都可用于研究基因的作用位点，有丝分裂重组也不例外。下面是 *stern* 最初研究造成性梳过量的组织突变时的实验。在最初的 *esc* 等位基因

中，雄蝇的中前腿若被诱导转化则会表现出性梳性状来。Tokunage 和 Stern 于是便诱导 $esc/+$ 杂合体来在果蝇腿中造成小块的突变组织。正如在所有其它嵌合体实验中，突变细胞必须加以标识以便识别。在有丝分裂重组中，标识基因应与被研究的哪个基因在同一条染色体上，以保证它们在诱变时同时成为纯和。有一点必须加以注意，我们可以容忍人纯和而标识不纯和现象，因为你只不过忽略了它。但我们不能容许出现标识纯和而突变不纯和的现象，因为你会以为它们同时纯和而犯下错误，会出现假阳性。一个好的方法是你选择更靠近着丝粒一端的基因做标记，那么你就不会犯错了。

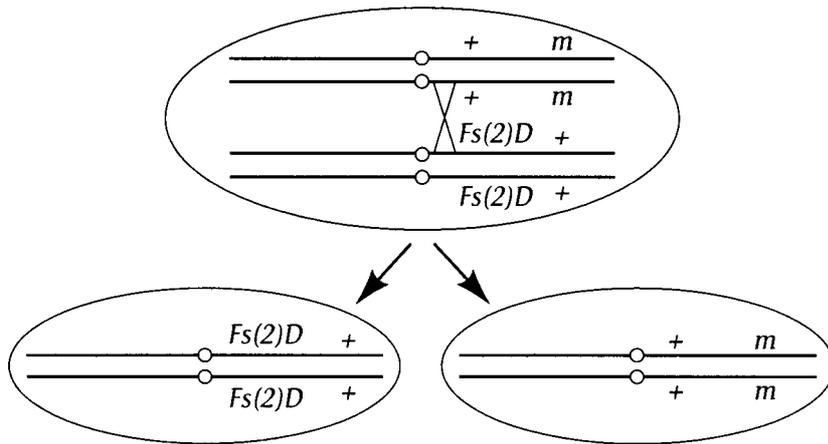
Tokunage和Stern使用了第2染色体左臂顶端带有野生型 y^+ 易位片段且杂合的果蝇。只要果蝇X染色体上 y 是突变的，任何的诱导重组将呈现出 y^+ 性状，称为 y clone。要使这一标识系统跟 esc 系统结合起来使用，只须将 y^+ 和 esc 易位片段杂合地置于两条同源染色体上即可。现在无论什么时候，只要 esc 被重组为纯和的， y^+ 将必定是纯和的，可是 y^+ 纯和 esc 却不一定纯和。一个更为简洁的实验是用翅膀甲壳标志 pwn 来标识 en 基因，通过选择比 en 更靠近着丝粒的标识基因，就可以保证不出现假阳性的标识的基因了。

§6.3.2.3 基因作用的时间

在前面讨论温度敏感突变时，我曾经提到过关于基因活动的关键时期的确定问题，可是并非所有的基因都有温度敏感等位基因。在这种情况下，我们仍可以通过有丝分裂重组在特定发育阶段除去正常的等位基因来确定某个基因活动的最后期限。当在此以后发生成功诱变，则不会出现相应的突变表型。这就表明了在某一时间后，某一正常基因的产物不再是必须的。也就是说这个时间是正常基因被除去后其产物能持续保持功能的时间。

某些基因，如 $bithorax$ 和 $Sex-lethal$ 就是用这种技术被确定为是在发育过程都是不可少的。而 $Sex-lethal$ 是由于基因的自我调控的存在故而是任何时候都不能缺少的。

Germline Clone 用有丝分裂重组来研究基因活动的时间的一个特例是突变的母系影响和合子影响间的差别。也就是由于许多基因不但对于卵子发生是重要的，同时也对合子和成虫的存活是重要的，因此很难获得雌性纯和突变体来检验基因的母系效应。**Wieschaus** 用显性的雌性不育突变很巧妙的解决了整个问题。此突变的杂合雌蝇在理论上是不育的，如果卵子发生时卵巢内出现有丝分裂重组现象，则会出现纯和的野生型卵子。



viable, fertile egg

由于此卵母细胞没有了显性雌性不育突变，故它可完成正常的卵子发生。故只有发生有丝分裂重组的卵子才能完成正常发育。当另一个所研究的突变也在已经纯和了的那条染色体臂上时，则此卵将在没有此基因产物的情况下进行发育。如果此基因是早期胚胎发育所需的，则会出现表型异常的胚胎。

很清楚这种方法的一个前提是此显性不育基因在卵母细胞中必须是自主作用的。因为成功诱变的卵巢体细胞在整个卵巢中占很小的比例，因而不能挽回最初的不育性，于是可用同样这种技术来初步的大致认定这个基因的细胞自主性。要进一步证实，则需将突变生殖细胞移植到正常背景或反过来做，即可严格确认其细胞自主性。

§6.3.2.4 制造有丝重组克隆的方法

电离辐射是诱导有丝分裂重组的最早采用的方法，就象它是第一种诱变剂一样。它是一种很简单的方法，只须 X 光机和一些杂合体幼虫即可。剂量效应关系早已弄清楚了。标准的可使重组率达到最大而致死率降为最低的剂量是 1000-1500r。

此法的弊端在与它对于细胞或别的活物是不太好的。一些会在处理过程中死掉，另一些即使存活也可能有组织损伤，而损伤组织又有可能在发育中出现，因细胞损伤而发生补偿性增生，而这些反应功能都是跟纯和突变基因的影响毫不相干的，有时甚至出现跟所研究的突变毫不相干的模式重复现象。

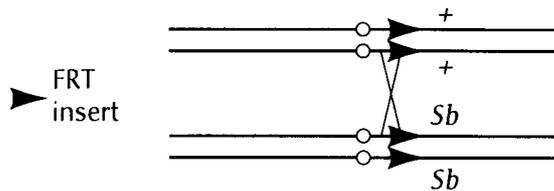
放射处理可以在生命周期的任何一个阶段进行，而只是在胚胎发生过程中才是对辐射完全敏感的。即便如此，仍在其中某些时段是表现出是辐射耐受的，故而能得到存活的携带有丝分裂重组细胞的果蝇。具体说来是受精后 3 小时及 7 小时后，10 小时达到最高存活率。当然用于研究胚胎时，发育阶段的同步化是十分重要的。

一个更加温和的诱导有丝分裂重组的方法是利用酵母中的位点特异的重组酶 **FLP** 和其目的序列 **FRT**，这套系统曾被用于产生染色体缺失和检验基因在发育中的活动时间。其诱发条件是热休克激活重组酶。故此法要在什么时候就什么时候，要什么地方就什么地方——只要不是前囊胚期，只要不是热休克达不到的地方。

这个方法好处在于比较温和，而且重组位点也是染色体上确定好的。知道了重组的方法位点，你就可以确保重组发生在标识基因和所研究的突变基因的近着丝粒一侧了。就如同一把双面刃，这种方法提高了重组诱导率，但要只诱发单细胞重组却又变得困难了。

此法的关键是：应该在两条同源染色体的相同位置上，而且 **FRT** 序列在同源染色体上必须方向一致的，因为唯有如此才能发生重组。如若方向相反，则会产生双着丝粒和无着丝粒的染色体片段。

热休克一般在幼虫期的末尾和蛹期的开始时进行。细胞发生重组的频率依赖于每条同源染色体上有无单个或顺序重复的 **FRT** 序列。



FRT genotype	Frequency of mosaics (%)	
	no heat shock	heat shock
$\frac{\text{FRT-FRT}}{\text{FRT-FRT}}$	97.0	99.5
$\frac{\text{FRT-FRT}}{\text{FRT}}$	31.1	58.5
$\frac{\text{FRT}}{\text{FRT}}$	1.3	43.7
$\frac{\text{FRT-FRT}}{+}$	—	0.3

Data from Golic 1991.

如此表所示，有多份 **FRT** 时即使未热休克自发重组频率仍很高。Xu 和 Rubin 就构造出在染色体臂近着丝粒处有双 **FRT** 插入的果蝇。

FRT-FLP 系统也适于获得种系克隆。标准处理在蛹的中到晚期实施可增加显性不育同步雌蝇的后代数量。

内部组织的标记

对那些不影响外层细胞的基因嵌和体的研究比那些影响的要落后许多，因为缺少合适的标识基因而且不好用。Kankel 和 Hall 以酸性磷酸酶组织化学作为标识系统。它们把野生型 *Acph* 位点易位到 X 染色体，然后用 *pal* 诱导其丢失。*Acph* 在除肌肉外的组织切片中都不赖。

另一个好的适合于各阶段和各种原肠形成后的组织的标识系统是 *lacZ* 和 *armadillo* 结构启动子融合体。由于它是以 P 因子为载体的，它他可以转移到任何一条染色体臂上。它的一个优点是对于其底物 X-gal 在大多数组织和大多数阶段都没有什么本底反应，故插入可作为显性标识。表达 *lacZ* 的增强子陷阱品系果蝇的繁殖导致许多染色体臂都有别的潜在的嵌和体的标识。一个已知增强子陷阱品系能否适用就要看这个酶在你想研究嵌和现象的组织里是否表达。Xu 和 Rubin 建立了用抗原标识来显示各阶段的组织的方法。他利用了 *mye* 蛋白的一个结构域和一个对其有抗原特异性的单克隆抗体。但此法的缺点是对嵌和的染色显示必须每次都毫无错漏的进行，而嵌和常常是特异且低发生频率的，最好的抗体染色也难以满足这个标准。

GAL4 与嵌和体的表达

转基因动物中的启动子融合事实上造就了另一类嵌和体，因为某一克隆基因可以被诱导表达。某一基因的选择表达可以通过与某一特定启动子序列融合实现，也可通过酵母转录因子 GAL4 激活来实现，而 GAL4 本身就是一个增强子陷阱。

这种方法不同与以往的嵌和体技术，因为嵌和方式不再是随机的了，它是可重复的，双侧对称的——即增强子驱动基因的一切性质。而可重复性对于进行那些表型不连续的嵌和体的研究及那些分析较困难的嵌和体研究是有着巨大好处的。

GAL4 增强子陷阱技术还有个好处是没有对启动子融合体的位置效应。由于同一 GAL4 增强子陷阱插入能独立的作用于其它带有激活序列的转基因，其表达模式可以用 UAS-LacZ 品系中 UAS-效应子的异位表达推断出来。这一技术曾用于研究胚胎期 *even-skipped* 异位表达的发育效应和局部性转化的行为学影响以及 *Raf* 在卵子发生时的表达。GAL4 可捕获一个复杂基因的增强子，就象 Vincent 为了分离 *Ubx* 调节的时间因子时所发现的那样。

GAL4 还有个优点是对温度敏感，29°C 时比 18°C 时更活跃。另一方面其缺点在于某些 GAL4 品系的表达模式不够恒定，或说对遗传背景变化较敏感。这些问题可以通过预先估量一定量个体的果蝇的表达模式和保持遗传背景连续性来得到控制。

细胞切除

启动子融合和 GAL4 增强子陷阱也可通过驱动有毒性基因的表达来除去细胞。要是真能用好，那搞果蝇的人们在面对搞线虫的人所称道的生物活性时就不会再觉得心虚了。双翅目毒素和蓖毒蛋白是受组织特异和时间控制的，但由于不能够很好控制毒素的表达，所以用起来也很困难。

一个有希望的办法是用蛇毒素的轻链来杀死细胞，它可阻止神经元突触的递质的释放。