

果蝇(*Drosophila melanogaster*)唾腺染色体的 制备及染色体识别

杨大祥 程劼 许也 张一语

(中国农业大学 生物学院,北京 100193)

摘要 果蝇(*Drosophila melanogaster*)唾腺染色体的制备与分析是果蝇细胞遗传研究的基本实验技术,也是非常流行的遗传学教学实验。国内绝大多数的实验教材介绍了这个实验的操作方法,但对于如何辨别染色体各条臂,并进而识别具体的带纹均未予以介绍。笔者详细介绍唾腺染色体的制备及拍摄、数码照片拼接方法;并着重介绍如何根据各条臂端粒端的形态特征,以及利用 Lefevre 的唾腺染色体照片图谱中指示的蓬突(puff)、缢缩及带纹组合特征识别染色体臂的方法,供研究和实验教学参考。

关键词 黑腹果蝇;唾腺染色体;染色体臂识别

中图分类号 Q 969.462.2; Q 243

文章编号 1007-4333(2014)01-0143-07

文献标志码 A

Preparation and identification of salivary gland chromosome of *Drosophila melanogaster*

YANG Da-xiang, CHENG Jie, XU Ye, ZHANG Yi-yu

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Polytene chromosome preparation is a basic technique in the *Drosophila* cytogenetics research, and is also a popular genetics laboratory investigation. Most laboratory menus provide protocols for polytene chromosome squash preparation, but they do not describe how to identify chromosome arms, and then to resolve the specific band(s). Here we provided detailed protocols for the polytene chromosome squash preparation, photography and the assemble of digital chromosome photos; and we described, especially for the beginner, how to recognize the chromosome arms of *Drosophila melanogaster* by the telomeric ends, landmark puffs, constrictions and the banding patterns indicated by Lefevre's photographic map of each of the chromosome limbs.

Key words *Drosophila melanogaster*; polytene chromosome; chromosome arms recognition

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)是遗传学研究最重要的模式生物之一。但它的染色体很小,正常有丝分裂中期的染色体总长仅 $7.5 \mu\text{m}$ ^[1],如此小的染色体用于构建细胞学图或观察减数分裂行为都是非常困难的。20 世纪 30 年代初,德国的植物遗传学家 Heitz 等^[2]重新发现了多线染色体,他们用压片法代替切片法,证明了双翅目昆虫毛蚊 *Bibio hortulanus* ($2n=10$)唾腺、马氏管等器官中巨大的线状结构“Spireme”不是此前学者们认为的由一条具横纹的线组成,而是 5 条臂围绕一个中心形成的

结构;Feulgen 反应结果表明这个结构本质上是一种染色体。这一结论迅速被 Painter 应用到果蝇的细胞遗传学研究中来^[3]。在果蝇唾腺等器官中,这种由核内有丝分裂(Endomitosis)形成的染色体,一条臂约含 1 000 多条染色质丝(最大可达 2 048 条)^[4];6 条臂总长达 $1\ 180 \mu\text{m}$,为有丝分裂中期染色体的 150 多倍,仅第Ⅲ染色体右臂(3R)的长度即达 $275 \mu\text{m}$ ^[1]。唾腺染色体臂上富有特征的、具有种的特异性的带纹(Band)众多,在光学显微镜与电子显微镜下,6 条臂分别计数了 5 059 与 5 076 条带

收稿日期:2013-05-31

基金项目:国家基础科学人才基金培养项目(J1103520)

第一作者:杨大祥,副教授,主要从事普通遗传学教学与研究,E-mail:dxyoung@cau.edu.cn

纹^[5](而在24条人类前中期染色体上,应用分带技术,最多能数出850条带纹^[6],且这个“带纹”包括了横纹及两横纹间的间纹)。这些带纹成了各条臂上天然的坐标。通过野生型与突变体带纹的比较,就可以了解染色体畸变的类型并定位变异的位置。遗传学理论教材如文献^[7]上常见的由于染色体重复而产生的棒眼与超棒眼即是一例。

唾腺染色体满足了细胞学家及遗传学家的梦想:尺寸足够大,臂上特征足够丰富,让研究者们能直观地在基因的载体上看到诸如缺失、重复之类的遗传物质的改变^[3],利用唾腺染色体制订了第一套高分辨率的细胞学图(Cytogenetic map),在这套图中,基因的位置与顺序与传统的遗传学图基本一致^[8]。20世纪70年代初,Pardue和Gall发明了唾腺染色体原位杂交方法^[9],这使得确定一段核酸在唾腺染色体上的位置变得非常方便。在果蝇基因组测序的早期实践中,原位杂交方法起了很大的作用。研究者将STS序列定位于唾腺染色体上,据此拼接DNA序列^[5]。在唾腺染色体上,不仅有DNA,也有与之结合的种种蛋白(如转录因子、酶和组蛋白等),这些蛋白可以通过免疫组织化学的方法显示出来。唾腺染色体这种巨大的结构也为研究染色质形态变化与这些蛋白之间的关系提供很大方便^[10-12]。果蝇属中有很多可以在唾腺染色体上检测出来的染色体重组;同时*Drosophila*属中有1600多个种^[13],研究材料丰富。这使唾腺染色体成了研究果蝇进化的重要工具^[14]。由此可见,果蝇的唾腺染色体是果蝇遗传研究中的重要工具。在近80年的研究中,积累了大量的论文、综述与专著,象文献^[15-17]这样详尽而全面的综述,对于深入了解唾腺染色体的结构与功能非常有帮助。

果蝇唾腺染色体的制备是果蝇遗传学研究的基本技术,也是各高等或中等院校最常做的教学实验,许多实验教材都介绍了这个实验,国内不少作者探讨了唾腺染色体的制备方法,企图获得更伸展的臂,更干净的背景等。但对于实验中最关键的问题(也是这个实验的主要目的)——如何从一团缠绕着的染色体中辨别各条臂,并进而学会识别臂上特定的带纹——却只字不提或语焉不详。有鉴于此,在这里介绍唾腺染色体的识别方法,旨在供研究和教学参考。

1 唾腺染色体的制备

通常采用压片法制备唾腺染色体用于一般的观

察。常用染色剂是乳酸-醋酸-地衣红^[18],这种染料有多种配方,多种染色方法^[18-20]。下述这种配法操作简单,效果良好:取2g地衣红,溶于50mL冰醋酸,30mL乳酸及20mL蒸馏水中,不加热或稍加热促进地衣红溶解,过滤,即可使用^[19]。做为一般的观察,也可以用改良石炭酸品红染色^[21]。比较而言,前者染色效果好些。研究上多用相差显微镜观察浅染的标本。相比于普通光学显微镜,相差显微镜能更好的观察到一些微弱的带纹。教学实验用普通光学显微镜即可。

幼虫应该在富营养的、虫口密度不高的培养基中培养,培养温度控制在20~22℃。从培养时间较长的培养瓶挑取幼虫制片效果不理想。关于幼虫培养,玻片硅化,永久片制做等问题,文献很多^[18-19,22-23],此处不再赘述。以下阐述笔者在教学实验中使用的制片方法,供参考。

取一张凹玻片,在凹孔内滴加0.7%的生理盐水,将幼虫放入其中。唾腺染色体的粗细与幼虫的龄期有关。较小的幼虫染色体复制的次数少^[4],唾腺染色体较细;化蛹前的幼虫,唾腺染色体达到最大,因此尽量选择龄期较大的幼虫。剖唾腺时,用2根解剖针,1根扎在距口器约为体长1/3的位置,固定不动;1根扎在口器上向外拉。剖出唾腺后,将大块的脂肪体剥离。脂肪体干扰制片,但有一点好处是可以让学生看到脂肪体中的多线染色体(臂特别细、带纹看得不是很清楚),与唾腺染色体做个比较。一张片子上最好有3~5个唾腺。

取一张干净的载玻片,滴45%醋酸,用解剖针将唾腺挑入其中固定0.5~1.0min。吸走醋酸,滴1滴染料。对于上述的乳酸-醋酸-地衣红,染色3~4min即可,改良石炭酸品红染10~15min。不可深染,深染使得很多带纹并在一起,无法看清,一些弱的带纹也无法显现(其机理可能是周围的背景色掩盖了带纹)。染毕,将多余的染料吸去,最后剩约6~8μL。

用镊子夹盖玻片(20mm×20mm或22mm×22mm)盖上,并对准唾腺所在方向将盖玻片压下去,使细胞铺展开来。用带橡皮头的铅笔将细胞敲破,将染色体敲散。这个过程需要耐心与细心。左手按住盖玻片的一角,右手持铅笔从垂直于盖玻片的方向,在唾腺细胞所在区域轻轻敲击(与有丝分裂的染色体不同,这个染色体很长,不能重击,不能搓动盖片,这样易使染色体断裂或拉伸变形),敲击几

下后放在显微镜下(100×)观察染色体是否分散开,如果没有则重复上述步骤,直至看到有臂散开来的细胞。取一片稍大于载玻片的滤纸片放在平整的实验台上,将片子翻转(盖玻片朝下)放在滤纸上,在载玻片上加盖一张滤纸片,2个大拇指垂直向下将材料压平。临时片可以用指甲油(透明或有色均可)封住盖玻片四周,待指甲油干燥后即可观察。

2 实验结果的拍摄及照片拼接方法

初学者通常很难在显微镜下直接分辨各条臂。一个较好的办法是尽量将分散良好的染色体拍摄下来,在电脑上用看图软件(如 ACDsee)观察、比对。挑选臂比较伸展、没有变形、带纹比较清楚的染色体,对着唾腺染色体图谱仔细分辨。

如果显微镜没有配备摄影装置,可以用具有3~5倍光学变焦功能的普通数码相机通过目镜取景拍摄^[24]。4~5个学生配备一台数码相机即可。为了使最终的照片比较清晰,拍摄时相机应该非常稳定,尽可能减少相机的震动。可以因陋就简用一个纸筒或PVC管套在目镜上充当三脚架,也可以在淘宝网上购买天文望远镜摄影支架或自制支架,固定在目镜上,再将相机固定在支架上,通过目镜取景拍摄(图1)。拍摄时务必将相机的自动闪光功能关闭,ISO尽可能小些(如设置成80,100),视需要增加0.5~1.0档曝光,如果相机支持,则尽可能将照片设成raw格式,这样便于后期处理。拍摄时半按快门(在有支架固定的前提下),再调整细准焦螺旋,

直至相机的液晶显示屏上清楚看到染色体条纹后再拍照,如果有快门线则尽量用快门线,没有则尽量用自拍模式拍摄,以减小相机震动。

唾腺染色体很大很长,当几条臂展开的时候,通常在一个视野中无法拍全。这种情况下需将全景分成上下左右几部分拍摄,再用图像处理软件(如 Adobe photoshop)合成全景图。这时要注意:1)调整好相机的位置,使照片不留暗角;2)拍摄时相机的所有参数要保持一致,相机绝不能移动;3)用显微镜的细准焦调好清晰度后,拍摄过程中不能再调整;4)连续的2张照片之间应该有至少1/5相互重叠的部分,计算机程序需要利用这个信息,将2张照片无缝拼接起来。以 Adobe Photoshop 为例,将同一个细胞不同部分的照片全部在 Adobe photoshop 打开,执行 File > Automate > Photomerge 命令,就可以合成一张完整的染色体图片了。有时重叠部分提供的信息不够,此时,相邻的部分照片需要手动拼接。

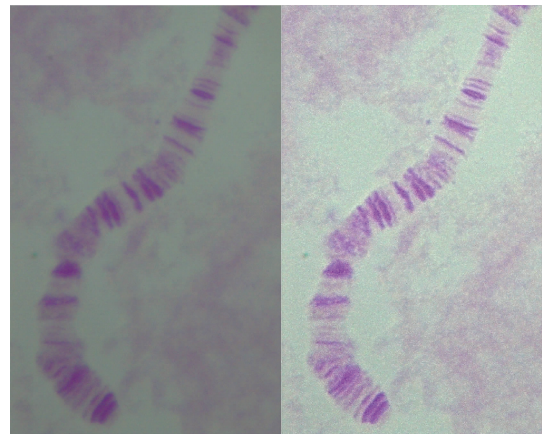
用图像处理软件对结果照片进行一些加工会使带纹看起来更清晰。笔者通常用 ACDSee V12 以上版本的“编辑”功能对照片进行处理;使用的参数主要有2个:一是白平衡,二是锐化处理。锐化处理是很关键的一步,这一步通常使用的参数大致是:数量设为300;半径设在12以上;阈值设为2以下。如此处理使照片的颗粒感增加,显得很粗糙,但是这样设置使一些较弱的带纹能清晰的显现出来(图2)。



显示通过天文望远镜支架将普通数码相机连接到显微镜上。
A digital camera is connected to a microscope via an adapter.

图1 一种简易的显微摄影装置

Fig. 1 A simplified microphotography apparatus



(a) 图像处理前 (b) 图像处理
(a) Before image process (b) After image process

图2 图像处理前(a)后(b)一段染色体臂比较
Fig. 2 Showing the same image of telomeric end of X chromosome before (a) and after (b) image process

3 唾腺染色体图谱

Bridges 绘制了唾腺染色体带纹图谱^[1],并且制订了一套作图术语。这套术语规定:将6条臂分成102区,第I至第III染色体每条臂20区,第IV染色体仅2个区。区与区之间是以深染的粗纹为界线,每个区又以A至F6个字母区分亚区,亚区内又以数字标记其中的带纹序号,例如:7D1即表示X染色体的第7区D亚区第1条带纹。这套术语非常特殊却非常合理,至今仍是“行业标准”。除细节很难分辨的第IV染色体外,这张图谱后来经Bridges父子5次修订^[25-29]。King^[8]以Bridges的原图为依据,将当时已知的基因及连锁图等数据整合到图谱上重绘了图。这些图的精确性得到了电子显微镜结果的证实。但模式化的线描图与实际的形态还是有些差距,在实践中应用起来比较困难,尤其对初学者更是如此。有鉴于此,Lefevre在Janet B. Kelley的帮助下,用黑白照片剪贴、翻拍的办法,拼出了6条臂的照片图谱^[19]。这套图谱带纹清晰,拼接得天衣无缝,有效地解决了线描图谱“不像实物”的问题,对研究人员识别染色体臂,进而识别具体带纹有很大的帮助,因此成了果蝇遗传学研究中最常用的唾腺染色体图谱。无疑,这张照片图谱也是在教学实验中引导学生“登堂入室”的重要图谱。

在使用这张照片图谱时应注意几点:照片图谱虽说是多个细胞观察结果的拼接,但是每段仅代表一个细胞的情况,并非很多细胞的平均结果,而且感光材料并不能将与周围组织反差很小的、染色很浅的细小带纹清楚地显示出来,这两种情况都使得照片图谱中的带纹比线描图谱中的带纹少很多。照片图谱中显示的大多是粗的、深染的带纹,这也是在实际制片中,在普通光学显微镜下能看到的带纹(但并非每次都能看到照片图谱上的全部带纹)。除带纹外,臂上还有许多蓬突、缢缩(Constriction,如3C,11A,89E等)等结构。这些带纹及其组合方式(Pattern),以及蓬突、缢缩对于每条臂而言,是特定的,也是恒定的。这是通过与照片图谱比对识别染色体臂的基础。但是要注意:实际制片中,并非每个细胞中都严格符合照片图谱所描述的特征,多少有些差异,但是相应部位突起或缩小的结构依然能看到,且其周围的带纹组合基本保持不变,比对2~3个区之后,就能找到图谱与实际结果间的对应关系(这点可见4.2中显示的例子)。照片图谱的另一个

缺点是许多带纹的颜色显得过深。

多线染色体亚显微结构可参见Sorsa等拍摄的唾腺染色体电镜图谱(<http://www.helsinki.fi/~saura/EM/index.html>)。

在非盈利目的的实验教学中,可以从flybase上获取并使用Bridges的线描图谱(1935年版,修订图谱则参见文献^[25-29])及Lefevre的照片图谱,网址为:<http://flybase.org/maps/chromosomes/maps.html>。图谱不能直接下载,可以通过逐段屏幕拷贝,再用Photoshop等软件拼接的方法得到完整图谱。屏幕拷贝结果粘贴到Photoshop建立新文件时,注意将分辨率设成230或300 dpi。拷贝时同样也要注意,拷贝的图像两两之间应该有至少1/5相互重叠的部分以便最后拼成全图。一条臂的端粒端(即游离的、远离染色中心的那端)往往有几种独特的形态,但这个图谱中每条臂仅显示了其中一种,而端粒端的形态是分辨染色体臂的重要标志。为便于学生识别起见,最好能将5个长臂端粒端常见的几种形态与照片图谱整合到一张图上,最后用彩色喷墨打印机将此图横向打印在一张纸A3大小的照片纸上,塑封。

4 唾腺染色体臂的识别方法

很多初学者非常感兴趣的一个问题是:果蝇有丝分裂中期的染色体与唾腺染色体在形态上有很大的区别,这两者之间的对应关系是如何建立的?首先建立联系的是第IV染色体,因为它是果蝇染色体组中最小的一对,因此推断唾腺染色体中最短臂就是它。在研究唾腺染色体前,Muller等^[30]人致力于建立以有丝分裂染色体为基础的细胞学图(当然分辨率很低),积累了大量的突变体,有些突变体在有丝分裂中期就能看到明显的染色体畸变,Painter推测^[3],这种畸变在唾腺染色体对应的那条臂上也能明显地看出来。试验证明,他的推测是正确的。Painter就是利用这种方法确定除第IV染色体外的其他5条臂的归属。例如,有一种突变体,其X染色体在分叉刚毛与棒眼两位点之间的断裂(Forked-Bar break),有丝分裂中期表现为两段X染色体^[30],以这种突变体进行唾腺染色体分析,果然找到了发生断裂的臂,显然,这条臂对应的是X染色体^[3]。D. melanogaster唾腺染色体的6条臂连接在由着丝点形成的染色中心(Chromocenter)上。每条臂的端粒端往往有几种比较固定的形态(其原因

未明),不同臂末端的形态易于相互区分(虽然有的末端的形态特征非常相似,如 2R 与 3R);每条臂端粒端的带纹特征基本恒定。实践中,可从唾腺染色体臂端粒端的形态及带纹特征入手初步判定染色体臂的归属,然后对照着照片图谱,再在臂的其他部位找到特征性带纹组合进一步验证初步的判断结果,采取“两点决定一条线”的策略“综合”判定一条臂。在有些情况下,端粒端被埋在其他臂底下,看不清楚,此时则采用在一条臂上取几段富有特征的片段

进行分析,相互印证。

下面逐个分析各臂的末端特征。这里显示的臂的末端,是以野生型黑腹果蝇的三龄幼虫为材料,从近千个细胞中挑选出来的。

在 6 条臂中,第 IV 染色体臂非常小、特征不明显,其上的带纹很难看清,形态似乎也在变化;其夹在几条臂末端及染色中心中,不易与周围的组织相区分,臂上没有诸如蓬突或缢缩这样的结构,或特征性的带纹,形态在不同的压片中有所变化(图 3)。

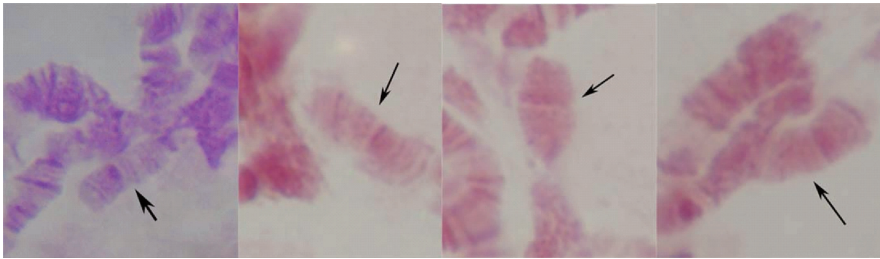


图 3 第 IV 染色体臂(图中箭头所指)的各种形态

Fig. 3 Light microscope photographs of chromosome IV (indicated by arrowhead)

4.1 5 条长臂端粒端特征

除第 IV 染色体外,其他 5 条均为长臂:第 I 染色体(X 染色体)1 条臂;第 II 及第 III 染色体左右各一条臂,分别记做 2L、2R 及 3L、3R。每条臂可资识别的标志有头尾 2 个末端形态及带纹组合的特征;臂上大小不同的蓬突、缢缩以及深浅、疏密的带纹组合(Banding patterns)。如果将带纹组合作一段段序列,则对野生型果蝇而言,每段序列都是独特的。Bridges 曾形象地描述了各条臂上的地标(Landmark)性结构^[1],6 条臂的详细特征描述可以参见文献[19]。

5 条长臂端粒端的几种常见的形态见图 4。

X 染色体头(图 4-1,-2,-3)象导弹,这个导弹头有时呈球形(图 4-3),导弹头下面 2B 位上有一个永久性的蓬突,这个蓬突可能较导弹头大,也有可能与其一样大,这是 X 染色体最突出的特征。导弹头有时并不垂直于蓬突,而是与蓬突形成一个夹角(图 4-2)。3C 位置上有一个明显的缢缩,图 4-3 中这个缢缩在压片时被拉开。

2L(图 4-4,-5,-6)头部象一把紫砂壶,“壶盖”有时很清晰,有时则不明显。在头部下方 25 区,有一个蓬突。2R(图 4-7,-8)的情况比较复杂。它的头部有一种形状,也象紫砂壶(图 4-7),与 2L 头相似。但是“壶盖底”的着色很深,另一种形状(图 4-8)则

与 3R 头(图 4-9,-10)非常相似。为了方便比较,此处调整了一下逻辑顺序,将 2R 与 3R 头集中在一起介绍。因为在一些制片中这 2 个头非常相象:当它们呈扇形展开时,都象一朵鸡冠花。但仔细分辨,两者还是有较大的区别:1) 2R 头部末端呈一波浪状,浪尖与浪谷深浅相间,看不到明显的纹;而 3R 头部末端呈展开状态时,顶端是规则的弧形,上面可以清楚地看到 2 条弧形的带纹(图 4-9,-10 中 1 的位置上),呈收缩状态时这两条带纹依旧很明显;2)带纹组合及特征性的带纹不同。在图 4-9,-10 中 2 的位置上,3R 有一条虚线状的带纹,而 2R 的相应位置上没有这条纹;在图 4-8 中 1 的位置上,2R 显现一条浅染一条深染的纹,而相应位置(图 4-9,-10 中 3 的位置)上 3R 则是 2 条深染的纹;在图 4-9,-10 的 4 的位置上,3R 稳定地显现 2 条平行的深染的纹;3) 2R 紧靠头部的 58E 位置上有一个明显的蓬突,而 3R 则没有,3R 在 98C 位上有一个缢缩。58E 蓬突前的 2R 头看起来象一个绘着深浅不同的线条的艺术花瓶。

3L(图 4-11,-12,-13,-14)头部象一顶僧帽,帽顶的细节不尽相同。在一些细胞中,这顶僧帽会变成各种大小的扇形帽。但是,无论帽子如何变,在普通光学显微镜下,在帽子下如图标示的 6 个位置上可以非常稳定地看到深染的纹,Bridges 在这 6 个位

置上辨认出 11 条带纹,其中位置 1~5 每条纹均含 2 条带,位置 6 仅 1 条带,这 6 个位置上带纹的排列规则是:位置 1 上的带纹象一条系在颈部的领带,领带的下面是 2、3、4、5 排列较紧的 4 条深色纹,6 则离这 4 条带纹稍远些。1 与 6 所在位置向里缩。

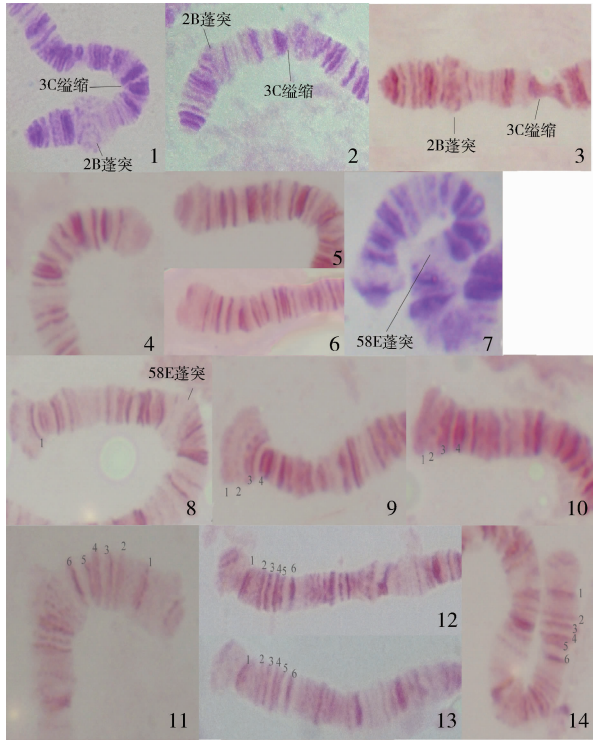


图 4 黑腹果蝇唾腺染色体头部的形态特征

Fig. 4 Telomeric ends of the X chromosome and 2L, 2R, 3L and 3R of *Drosophila melanogaster*

4.2 着丝粒端及臂上的特征

5 条长臂着丝粒端(图 5)的特征不如端粒端那样直观。但仔细分辨,还是能将几条臂区分出来。2L(36-40 区)与 2R 尾部(41-44 区),深染的带纹间相距较远,使其看起来象毛竹的根部;但 2R 尾部的 43E 蓬突是个特征性的标志,外形上它非常象个古兵器中的锤,使其很容易与 2L 区分开来。3R 的尾在 81、82 和 83 3 个区,带纹颜色较 3L、X 浅,形状上象个黄瓜,81 区与染色中心连接的部位象一把汤匙,这是这条臂尾的特征性标志之一。这 3 个臂尾是相对比较易于识别的。

蓬突(图 6)也是识别臂的重要标志,有些蓬突及其前后的带纹组合几乎可以起到“一锤定音”的作用,如 85F,蓬突本身色泽较浅,质感较粗糙,其后的 86 区内是几条深染的粗纹,而其前的 85B-E 区内则

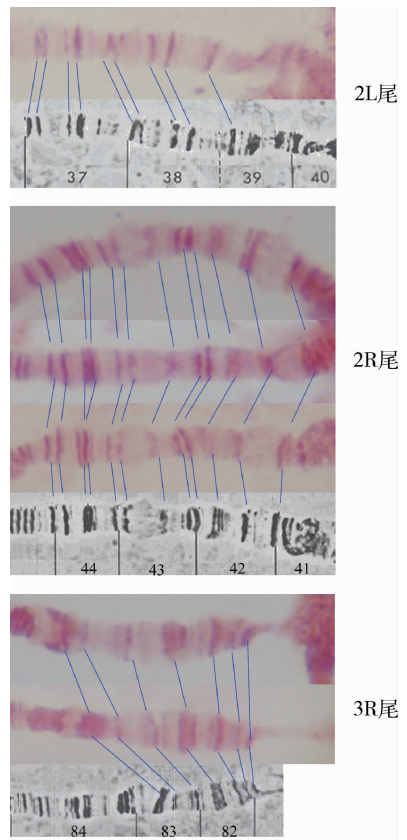


图 5 2L、2R 与 3R 着丝粒端特征及与照片图谱的比对

Fig. 5 Photograph of centromere ends of chromosome arms 2L, 2R and 3R are “aligned” with corresponding regions present in Lefevre’s photographic map

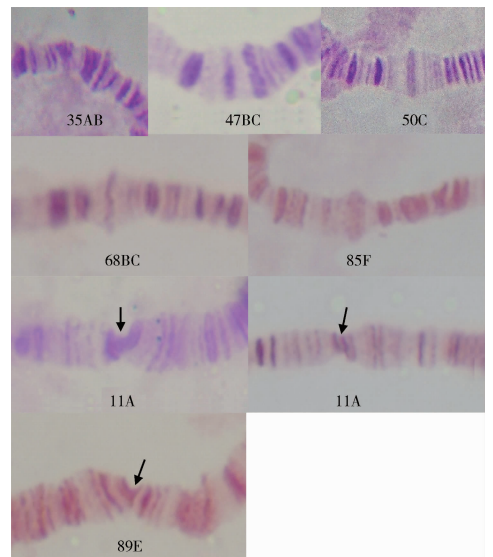


图 6 臂上常见的几个蓬突与缢缩

Fig. 6 Show some major puffs and constrictions commonly find in salivary gland chromosome arms of *Drosophila melanogaster*

是浅染的粗纹,找到这个蓬突,就可以基本确认臂的归属了。5 条长臂上比较明显的蓬突有: X 染色体上的 2B; 2L 上的 25BC、35AB; 2R 蓬突数量最多,有 42A、43E、47BC、50C、56D 和 58E 共计 6 处,且基本上都较明显,这也是识别这条臂的重要标志; 3L 上的 68BC; 3R 上的 85F。其中这些地标的前后的带纹组合通常也非常有特征。实际制片中,35AB 与 68BC 容易混淆,这是需要仔细分辨的 2 个结构。缢缩(图 6)也是唾腺染色体臂上的一种结构。但它们通常没有蓬突明显,且在制片中容易变形,使识别起来较困难。比较明显的有 X 染色体上的 3C、11A; 2L 上的 35D、36C; 3R 上的 89E。

参 考 文 献

- [1] Bridges C B. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Heredity, 1935, 26(2): 60-64
- [2] Zacharias H. Emil Heitz (1892—1965): Chloroplasts, heterochromatin, and polytene chromosomes [J]. Genetics, 1995, 141(1): 7-14
- [3] Painter T S. Salivary chromosomes and the attack on the gene [J]. Journal of Heredity, 1934, 25(12): 465-476
- [4] Henderson D S. The Chromosomes of *Drosophila Melanogaster* [M]. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2004, 247: 1-43
- [5] Siden-Kiamos I, Saunders R D C, Spanos L, et al. Towards a physical map of the *Drosophila melanogaster* genome: Mapping of cosmid clones within defined genomic divisions[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(21): 6261-6270
- [6] Francke U. Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications [J]. Cytogenetic and Genome Research, 1994, 65(3): 206-219
- [7] 戴灼华, 王亚馥, 粟翼玖. 遗传学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2008
- [8] King R. *Drosophila melanogaster*: An introduction [J]. Handbook of Genetics, 1975(3): 625-652
- [9] Pardue M L, Gerbi S A, Eckhardt R A, et al. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera[J]. Chromosoma, 1970, 29(3): 268-290
- [10] Cai W, Ye J, Jack G, et al. Preparation of drosophila polytene chromosome squashes for antibody labeling[J/OL]. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2010(36). [2013-05-26]. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1748>
- [11] Johansen K M, Cai W, Deng H, et al. Polytene chromosome squash methods for studying transcription and epigenetic chromatin modification in *Drosophila* using antibodies[J]. Methods, 2009, 48(4): 387-397
- [12] Murawska M, Brehm A. Immunostaining of *Drosophila* Polytene Chromosomes to Investigate Recruitment of Chromatin-binding Proteins [M]. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2012, 809: 267-277
- [13] Powell J R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model [M]. New York: Oxford University Press, 1997
- [14] Sorsa V. Polytene Chromosomes in Genetic Research[M]. New York: John Wiley & Sons, 1988
- [15] Zhimulëv I F. Morphology and structure of polytene chromosomes[J]. Advances in Genetics, 1996, 34: 1-490
- [16] Zhimulëv I F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation[J]. Advances in Genetics, 1997, 37: 1-555
- [17] Zhimulëv I F. Genetic organization of polytene chromosomes [J]. Advances in Genetics, 1999, 39: 1-589
- [18] Tonzetich J. Orcein Staining and the Identification of Polytene Chromosomes[M]. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2004, 247: 249-256
- [19] Lefevre G. A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands[J]. The Genetics and Biology of *Drosophila*, 1976(1): 31-66
- [20] 戴灼华, 韩文智. 中国 *D. virilis* 果蝇唾腺染色体的初步观察 [J]. 遗传, 1986, 8(2): 23-24
- [21] 杨大翔. 遗传学实验[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2010
- [22] 彭先步, 王明忠. 一种新的果蝇唾腺染色体制片方法[J]. 遗传, 1992, 14(2): 35-36
- [23] Kennison J A. Preparation and analysis of polytene chromosomes[C]//Sullivan W, Ashburner M, Hawley R S. *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 111-117
- [24] 杨大翔. 用普通数码相机进行显微摄影的方法与技巧[J]. 生物学教学, 2004, 29(10): 57-58
- [25] Bridges C B. A revised map of the salivary gland X chromosome of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Heredity, 1938, 29(1): 11-13
- [26] Bridges C B, Briges P N. A new map of the second chromosome: A revised map of the right limb of the second chromosome of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Heredity, 1939, 30(11): 475-478
- [27] Bridges P N. A revised map of the left limb of the third chromosome of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Heredity, 1941, 32(2): 64-66
- [28] Bridges P N. A revision of the salivary gland 3R chromosome map of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Heredity, 1941, 32(9): 299-300
- [29] Bridges P N. A new map of the salivary gland 2L-chromosome of *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Heredity, 1942, 33(11): 403-408
- [30] Muller H, Painter T. The differentiation of the sex chromosomes of *Drosophila* into genetically active and inert regions[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1932, 62(1): 316-365