

XIBAO SHENGWUXUE YU
YIXUE YICHUANXUE SHIYAN

[第3版]

细胞生物学与医学遗传学实验

主编 陈 辉 贺 颖 封青川



郑州大学出版社

XIBAO SHENGWUXUE YU
YIXUE YICHUANXUE SHIYAN

[第3版]

细胞生物学与医学遗传学实验

主编 陈 辉 贺 颖 封青川



郑州大学出版社

郑州

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学与医学遗传学实验/陈辉,贺颖,封青川主编.—3版.—郑州:
郑州大学出版社,2015.3

ISBN 978-7-5645-2188-2

I. ①细… II. ①陈…②贺…③封… III. ①细胞生物学-实验-医学
院校-教材②医学遗传学-实验-医学院校-教材 IV. ①R329.2-33②R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 028650 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人:张功员

全国新华书店经销

郑州龙洋印务有限公司印制

开本:787 mm×1 092 mm 1/16

印张:12.75

字数:297 千字

版次:2015 年 3 月第 3 版

邮政编码:450052

发行电话:0371-66966070

印次:2015 年 3 月第 4 次印刷

书号:ISBN 978-7-5645-2188-2

定价:26.00 元

本书如有印装质量问题,由本社负责调换

作者名单

主 审 程晓丽

主 编 陈 辉 贺 颖 封青川

编 者 (以姓氏笔画为序)

刘 华 齐 华 李晓文

宋国英 陈 辉 郑 红

封青川 贺 颖 贾利云

程晓丽

21 世纪是生命科学的时代,在面向新世纪的医学教育中,细胞生物学与医学遗传学已成为推动医学分子水平发展的带头学科。为适应自然科学的发展及现代医学教育改革,根据医学细胞生物学与医学遗传学教学大纲的要求,以培养学生创造性思维,提高学生在实验课中发现问题、提出问题、解决问题的能力为目标,我们组织编写了《细胞生物学与医学遗传学实验》(第3版)。

《细胞生物学与医学遗传学实验》第3版在保持第2版基本框架的基础上进一步强调了“细胞生物学”作为核心课程的基础实验部分及作为“医学遗传学”延伸内容的临床部分内容,以加强学生的基础实验操作技能并增加学生学习的兴趣,使他们能够及时掌握学科发展动态,提高综合科研及创新能力。

《细胞生物学与医学遗传学实验》在内容编排上分为四个部分:医学细胞生物学实验、医学遗传学实验、综合性实验和研究性实验。

本书在编写过程中得到了院领导、教研室全体教师员工的大力支持,得到了郑州大学出版社的支持与帮助,另外,曹慧敏、范玉佳、孙燕、张玉超等在校研究生参与了部分文稿的整理工作,在此一并表示衷心的感谢。

鉴于作者的经验和写作能力有限,编写过程中难免出现不足之处,真诚希望使用本书的老师和同学提出批评和改进建议。

作者

2014 年 12 月

为了适应自然科学的发展及现代医学教育改革,根据“医学细胞生物学与医学遗传学教学”大纲的要求,按照当前学科发展特点和国家卫生部“十一五”期间对医疗卫生和教育系统科学发展要注重培养高素质复合型医药卫生人才的总体要求,编写组在总结老一代专家、教授和实验师丰富工作经验的基础上,广泛吸收国内外同类院校的先进教学理念,经过充分酝酿、讨论和准备,组织编写了《细胞生物学与医学遗传学实验》(第2版)。

本书在内容编排上分为四个部分:医学细胞生物学实验、医学遗传学实验、综合性实验和研究性实验。其中新增设的综合性和研究性实验将医学研究领域的新技术、新方法 with 本科实验教学有机结合起来,通过 RFLPs 技术在 FVIII 基因检测中的应用、PCR-SSCP 技术分析在 hMSH1 基因突变检测中的应用、荧光原位杂交技术在慢性粒细胞白血病检测中的应用及苯丙酮尿症的筛查、血管紧张素转换酶基因遗传多态性分析等新型实验教学内容,深入细致地分析、鉴定临床常见遗传学疾病,突出专业基础教育在医学整体教育中的重要性;通过银染技术对核仁形成区的分析、Southern 印记转移、流式细胞技术对实体瘤组织细胞周期和 DNA 倍体分析、细胞传代培养及增殖动力学监测及细胞的冻存与复苏等实验内容,激发学生产生参与科学研究的愿望与兴趣,以避免专业基础教学与科学研究脱节。

为了增强基础实验对培养学生动手能力的作用,本书将传统的细胞生物学与医学遗传学实验中的部分内容调整为小型开放性实验,要求学生根据现有条件和已知原理,自行设计并完成实验。为了提高学生对群体遗传学的学习兴趣、提高学生对人体遗传性状和遗传病的观察与分析能力以及学生对系谱的认知和分析能力,本书增添了基因频率与基因型频率的统计和计算,增补了人类部分体表性状、行为习惯及部分常见疾病的遗传机制等内容。为了开拓学生的视野、加强学生对专业基础英语的学习,本书还为 27 个实验精选了相关英文内容。另外,本书还着力开发图示实验内容,以期提高教材的直观性和实用性。本书可供医药院校专科生、本科生和研究生选用,也可供教师、科研人员与科教管理人员参考。

本书在编写过程中得到了院领导、教研室全体教师员工的大力支持,得到了郑州大学出版社的支持与帮助,另外,张华、温文静、刘书莲等在校研究生参与了部分文稿的校对工作,在此一并表示衷心的感谢。

由于知识水平和写作能力有限,我们在编写的过程中难免出现不足甚至错误,希望使用本书的老师和同学提出宝贵意见,以便在修订时加以改进。

程晓丽 郑红

2007 年 3 月

实验室规则及报告要求	1
第一部分 医学细胞生物学实验	3
实验一 普通光学显微镜的结构及使用	3
一、显微镜的构造	4
二、显微镜的使用方法	6
三、操作练习	7
四、使用显微镜的注意事项	8
实验二 细胞基本形态与结构	11
一、人口腔黏膜上皮细胞的制片与观察	11
二、洋葱鳞茎表皮细胞的制片与观察	12
三、大白鼠小肠上皮切片的观察	13
四、骨骼肌纵切片的观察	13
五、平滑肌纵切片的观察	14
六、猪、兔、牛等脊髓灰质前角神经细胞涂片的观察	14
七、蛙(或蟾蜍)血涂片标本的制作与观察	14
实验三 细胞的生理活动	17
一、红细胞膜的通透性和溶血现象的观察	18
二、细胞运动现象的观察	19
三、巨噬细胞吞噬现象的观察	19
实验四 细胞器的分级分离	21
一、细胞核的分离	22
二、线粒体的分离	23
三、溶酶体的分离	23
四、微粒体的分离	23
实验五 细胞骨架的制备与观察	25
一、考马斯亮蓝 R250 染色法观察微丝	26
二、间接免疫荧光法观察微管	26
实验六 细胞中线粒体的活体染色	29
实验七 细胞有丝分裂	31

一、植物细胞有丝分裂	32
二、马蛔虫卵细胞的有丝分裂	33
实验八 细胞减数分裂	36
一、蝗虫精巢生殖细胞减数分裂	37
二、小鼠睾丸生殖细胞减数分裂标本制备	40
实验九 小鼠骨髓细胞染色体制备与观察	42
一、小鼠骨髓细胞染色体制备	43
二、小鼠骨髓细胞染色体观察	44
三、G 显带小鼠染色体核型	45
实验十 细胞原代培养	47
一、实验预备	48
二、操作与观察	48
实验十一 细胞融合和染色体提前凝集(PCC)技术	52
一、细胞融合的诱导与观察	53
二、染色体提前凝集(PCC)标本的制备(见图 11-2)	55
实验十二 细胞的冻存与复苏	59
一、培养细胞的冻存	60
二、培养细胞的复苏	60
 第二部分 医学遗传学实验	62
实验十三 人类性染色质标本的制作与观察	62
一、X 染色质的制备与观察	63
二、Y 染色质的制备与观察	64
实验十四 人类皮肤纹理分析	67
一、皮纹资料印取方法	68
二、皮肤纹理的分析	69
三、遗传病的皮纹变化	75
实验十五 遗传病的系谱分析	78
实验十六 人类遗传性状的观察与分析	85
一、人类 ABO 血型的检测和遗传分析	85
二、人类苯硫脲尝味能力的遗传分析	88
三、人体常见性状的群体遗传分析	90
附录 人类部分性状与遗传机制	94
实验十七 苯丙酮尿症的诊断与筛查	96
一、PCR-STR 法诊断苯丙酮尿症	97
一、基因组 DNA 的提取	98
二、PCR 扩增目的基因片段	98
三、PCR 产物的检测	99

四、结果分析	99
二、苯丙酮尿症的筛查	100
一、Guthrie 细菌抑制法	100
二、 FeCl_3 筛查试验	100
实验十八 PCR-RFLP 技术在甲型血友病基因诊断中的应用	102
一、基因组 DNA 的提取	103
二、PCR 扩增目的基因片段	104
三、PCR 产物的鉴定	104
四、限制性内切酶酶切	104
五、电泳分型	104
六、结果分析	104
实验十九 核仁形成区与随体联合的银染与观察	106
实验二十 Southern 印迹杂交	109
一、获得 PUC19 质粒 DNA(由老师准备)	111
二、质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	111
三、Southern 转移	111
四、Southern 杂交	112
五、放射自显影	112
实验二十一 PCR-SSCP 分析技术在 p53 基因突变诊断中的应用	114
一、PCR 反应	115
二、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	116
三、聚丙烯酰胺凝胶染色	117
四、结果分析	117
第三部分 综合性实验	120
实验二十二 人类染色体标本的制备与分析	120
一、人类外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备	121
二、人类体细胞染色体的核型分析	124
三、人类体细胞 G 显带染色体标本的制作、观察与核型分析	129
实验二十三 运用细胞遗传学技术进行遗传毒理效应的检测	137
一、致染色体畸变的方法与观察	137
二、微核测定法检测哺乳动物骨髓细胞染色体畸变	140
三、姐妹染色单体分化染色和姐妹染色单体互换标本的制备与分析	143
实验二十四 血管紧张素转换酶基因多态性分析与检测	147
一、人血细胞基因组 DNA 的提取	148
二、聚合酶链反应扩增 ACE 基因	149
三、PCR 产物的电泳分析	151
四、ACE 基因多态性的统计分析	153

实验二十五 细胞传代培养及增殖动力学检测	154
一、细胞的传代培养	154
二、生长曲线的测定	157
三、有丝分裂指数的测定	159
四、克隆(集落)形成实验	162
第四部分 研究性实验	164
实验二十六 荧光原位杂交技术及应用	164
实验二十七 流式细胞技术在生物医学研究的应用	170
一、实体瘤组织细胞周期检测	174
二、细胞凋亡检测	177
附 录	181
一、器械的清洗与灭菌	181
二、部分溶液和细胞培养基的配制	182
三、化学试剂的分级和保存方法	189
四、一些常用单位	190
五、核酸、蛋白质换算数据	192
六、希腊字母表	193

实验室规则及报告要求

一、实验室规则

1. 进入实验室要自觉遵守纪律,保持安静,不大声喧哗、嬉笑,不乱动仪器和其他设备,在指定实验台进行实验,爱护仪器,节约用品。

2. 实验开始前,要认真预习实验内容并按照实验要求检查实验用品是否齐全,如有缺损及时报告教师;实验过程中,按照规定的实验内容进行实验,遵守操作规程。

3. 保持实验室的清洁、整齐,不随地吐痰,实验室中的废纸等垃圾必须放在指定容器中。

4. 爱护实验室的一切公物,注意节约用水、用物,若损坏了仪器、药品,必须及时报告教师,说明原因,并按照实验室规定酌情赔偿。

5. 严格遵守实验操作安全规则,腐蚀性药品、有毒药品要小心使用。

6. 实验完毕后按要求把实验物品分类放到指定位置,把器皿洗刷干净后放回原处。各班要留一小组学生打扫实验室,把实验桌面擦干净,把地面打扫干净,并检查水池是否堵塞,门、窗、水、电是否关好,经老师检查验收后方可离开实验室。

7. 根据实验记录认真填写实验报告。

二、对实验报告的书写要求

实验报告是记录每次实验的作业完成形式,要如实反映实验结果,绘图要真实客观、实验数据要准确可靠。根据记录形式的不同,实验报告一般分为以下三类:

1. 文字描述 将实验过程和实验结果以客观文字的形式进行描述,并进行分析。文字描述应简明扼要、重点突出、条理清晰、数据准确。

2. 绘图 绘图时应使用 2H 或 HB 铅笔,不能用彩色铅笔或钢笔、圆珠笔等;绘图前应对标本仔细观察,按照显微镜下所见的实物物像进行绘制,力求真实、准确、一致;生物绘图应注意线条清晰明确,以点和线来表述细胞的形态,图的明暗以疏密不同的细点(注意打点时铅笔应垂直点下)来表示;绘图完成后,应注明标题与标本结构名称,注解用不带箭头的平行引线引出,并且长短应适当,末端平齐,注解应整洁、清晰。

3. 列表 表格应设计合理、美观,将实验结果和实验过程对应填写,有利于直观、明了地统计实验结果,并进行相互分析。

第一部分

医学细胞生物学实验

实验一 普通光学显微镜的结构及使用

【英文概述】

The light microscope, so called because it employs visible light to detect small objects, is probably the most well-known and well-used research tool in biology. Yet, many students and teachers are unaware of the full range of features that are available in light microscopes. Since the cost of an instrument increases with its quality and versatility, the best instruments are, unfortunately, unavailable to most academic programs. However, even the most inexpensive "student" microscopes can provide spectacular views of nature and can enable students to perform some reasonably sophisticated experiments.

【实验目的】

1. 熟悉一般光学显微镜的结构和原理。
2. 熟练掌握普通光学显微镜的操作方法。

【实验原理】

普通光学显微镜是生物医学领域最常用的仪器之一,它通过一组复杂的光学透镜将标本放大,以便观察和分析。光学显微镜是根据透镜成像的原理对微小物体进行放大的。当被检物体 AB 放在物镜 O_1 前方的 $1 \sim 2$ 倍焦距之间,光线通过物镜 O_1 在镜筒中形成一个倒立的放大实像 A_1B_1 ,实像 A_1B_1 位于目镜 O_2 的焦点上,通过目镜放大成一个倒立的虚像 A_2B_2 ,通过调焦装置使 A_2B_2 落在人眼的明视距离(250 mm)处,此时眼睛所看到 A_3B_3 为清晰的和 A_2B_2 相对应的实像(图 1-1)。

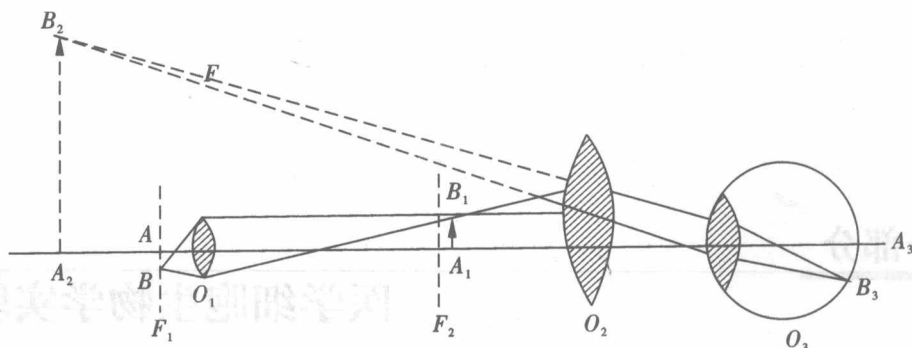


图 1-1 光学显微镜的放大原理和光路图

O_1 —物镜; O_2 —目镜; O_3 —眼球; F_1 —物镜的前焦点; F_2 —目镜的前焦点

【实验准备】

器材 普通光学显微镜。

试剂 乙醇乙醚混合液、香柏油。

材料 a 字母装片、血涂片、擦镜纸等。

【实验内容】

一、显微镜的构造

普通光学显微镜是由位于同一光轴的两个正透镜物镜和目镜组成的,主要由光学系统和机械装置两大部分构成(图 1-2)。

(一) 机械装置

1. 镜座 位于最底部,是整个显微镜的基座,质量大,降低了整体重心,起到支撑和稳固的作用。

2. 镜臂 镜臂是支持镜筒和载物台的呈弓形或柱状结构的部分,是搬动显微镜时手握的部位。

3. 准焦螺旋 也称调节器,是调节焦距的装置,分粗准焦螺旋(大螺旋)和细准焦螺旋(小螺旋)两种。粗准焦螺旋可使镜筒或载物台做较快或较大幅度的升降,能迅速调节好焦距,适用于低倍镜观察时调焦。细准焦螺旋可使镜筒或载物台缓慢或较小幅度地升降,适用于在低倍镜下用粗准焦螺旋找到物体后,在高倍镜或油镜下进行精细调节。

4. 镜筒 位于镜臂的前方,上端装载目镜,下端连接物镜转换器。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式和双筒式。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种,镜筒直立式光镜的目镜与物镜的光轴在同一直线上;镜筒倾斜式光镜的目镜与物镜的中心线互成 45° 角,在镜筒中装有使光线转折的 45° 棱镜;双筒式光镜的镜筒均为倾斜式的。

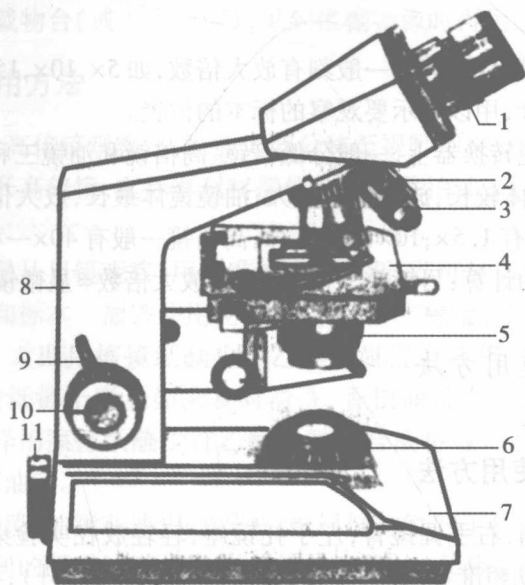


图 1-2 显微镜的结构

1-目镜;2-物镜转换器;3-物镜;4-载物台;5-聚光镜;6-集光镜;
7-底座;8-镜臂;9-粗准焦螺旋;10-细准焦螺旋;11-光源连接座

(引自中华医学检验全书)

5. 物镜转换器 位于镜筒下端的一个可旋转的圆盘上,一般装有2~6个放大倍数不同的物镜。旋转物镜转换器就可以转换物镜。物镜转换器边缘有一卡榫,当旋至物镜和光路呈直线时,就发出“咔”的轻响,这时光路通畅,目镜、物镜正对着通光孔中央位置,眼睛可观察到玻片标本。

6. 载物台 位于镜臂下面的平台,用以承放玻片标本,又称镜台。载物台中央有一圆形的通光孔,光线可以通过它由下向上反射。

7. 推进器 位于载物台的后方或侧面边缘,连接一个可动弧形弹簧夹。其上方或下方一侧有两个旋钮,转动旋钮可调节推进尺,使玻片标本前后或左右移动。标本推进器上有纵横游标尺,用以标定标本在玻片中的方位。

(二) 光学系统

1. 反光镜 反光镜是装在载物台下、镜柱前的一面可转动的圆镜,反光镜有平、凹两面。平面镜聚光力弱,适合光线较强时使用;凹面镜聚光力强,适合光线较弱时使用。转动反光镜,可将光源反射到聚光镜上,再经载物台中央通光孔打到标本上。

2. 聚光镜 聚光镜是位于载物台下方的一组透镜,用以聚集光线增强视野的亮度。载物台下方有一个调节旋钮,转动调节旋钮可升降聚光镜。上升时增强反射光,下降时减弱反射光。

3. 光栅 光栅是在聚光镜底部的一个圆环状结构。光栅装有多片半月形的薄金属

片,叠合在中央呈圆孔形。在圆环外缘有小柄,拨动小柄可使金属片分开或合拢,用以控制进入光线的强弱。

4. 目镜 装在镜筒上端,其上一般刻有放大倍数,如 $5\times$, $10\times$, $15\times$ ($\times$ 表示放大倍数)。目镜内常装有一指示针,用以指示要观察的标本的位置。

5. 物镜 装在物镜转换器上,一般分低倍镜、高倍镜和油镜三种。低倍镜镜体较短,放大倍数小;高倍镜镜体较长,放大倍数较大;油镜镜体最长,放大倍数最大(在镜体上刻有数字)。低倍镜一般有 $1.5\times$, $10\times$, $20\times$ 三种,高倍镜一般有 $40\times$ 一种,油镜一般是 $100\times$ 。

显微镜放大倍数的计算:目镜放大倍数 $\times$ 物镜放大倍数=显微镜对实物的放大倍数。

二、显微镜的使用方法

(一)低倍镜的使用方法

1. 准备 打开镜箱,右手握镜臂,左手托镜座,轻轻放在实验桌的偏左侧,镜座后端距桌边缘约5 cm。转动粗准焦螺旋,使载物台下降(或镜筒上升),再转动物镜转换器,使物镜主轴对准通光孔中央,当听到微小的扣撞声或手感到有阻力时立即停止转动,说明目镜、物镜光路通畅。

2. 对光 打开光圈,上升聚光器,双眼同时睁开,用左眼从目镜观察,转动反光镜使凹面朝向光源,直到视野内光线明亮均匀为止。

3. 置片 将玻片标本有盖片一面朝上置于载物台上,用推进器上的卡片固定标本,然后移动推进器,将标本移至通光孔中央。

4. 调节焦距 从侧面注视低倍镜,转动粗准焦螺旋,使载物台上升(或镜筒下降),使物镜距标本约0.5 cm,左眼从目镜观察,同时用粗准焦螺旋使载物台缓慢下降(或镜筒上升)直到视野中出现物像为止。若物像偏离视野,可用推进器使物像移到视野中央,最后再用细准焦螺旋调节,使物像更清晰。

(二)高倍镜的使用方法

1. 预备 依上法先用低倍镜找到物像,将需要放大部分移至视野中央,调至最清晰程度。

2. 更换物镜 从侧面注视物镜,转动物镜转换器,使高倍镜对准通光孔。现在常用的光学显微镜一般为共焦距显微镜。若低倍镜找到物像后,转换高倍镜便能基本看到标本轮廓,此时用细准焦螺旋调节至清晰即可。若镜头碰撞玻片标本转不过来,说明低倍镜焦距未调节好,应再用低倍镜调节;或玻片标本反面朝上时也会造成高倍镜头不能转到正确位置,此时需要将标本正面朝上。

3. 调节焦距 左眼从目镜观察,缓慢转动细准焦螺旋(勿用粗准焦螺旋),一般上下转动不超过一圈即可看到清晰的物像。若微调看不到物像,可能存在的原因如下:①低倍镜未调清晰;②所观察标本未移至视野中央;③玻片标本正面朝下;④物镜不配套,高倍镜头过长,经移动载物台或镜筒才更换过来的,此时则需直接用高倍镜调焦,即从侧面

观察,使高倍镜头下降到和玻片标本几乎接触的距离,然后一面从视野中观察,一面用粗准焦螺旋极缓慢下降载物台(或上升镜筒),见到模糊物像时再用细准焦螺旋微调即可。

(三) 油镜的使用方法

1. 预备 先用低、高倍镜观察,将需放大部分移至视野中央。
2. 更换物镜 转开高倍镜,在标本观察部位加 1 滴香柏油,转动物镜转换器,使油镜镜面浸在油滴内。
3. 调节焦距 左眼从目镜观察,用细准焦螺旋微调,即可见高度放大的清晰物像。
4. 清洁油镜镜头和标本 油镜使用完毕,转动粗准焦螺旋,使载物台下降(或镜筒上升),将油镜镜头转开,立即用擦镜纸蘸少许乙醇乙醚混合液将镜头上的香柏油轻轻擦掉,然后再用新的擦镜纸擦干净。如未及时清洗,香柏油可干结在镜头上,影响物镜观察。有盖片的标本同样用擦镜纸蘸少许乙醇乙醚混合液将盖片上的油擦干净。临时制片因有水分,不能使用油镜。

上述低倍镜、高倍镜、油镜在使用过程中,可根据物镜的工作距离(当物镜清晰时物镜镜面与玻片标本之间的距离),确定每个物镜的高度,对共焦距显微镜来讲,不同倍数的物镜基本处于同一焦平面上。因此成像后再换高倍镜或油镜,都应见到物像,用细准焦螺旋微调即可。从图 1-3 上可见,物镜放大倍数越高,工作距离越短。

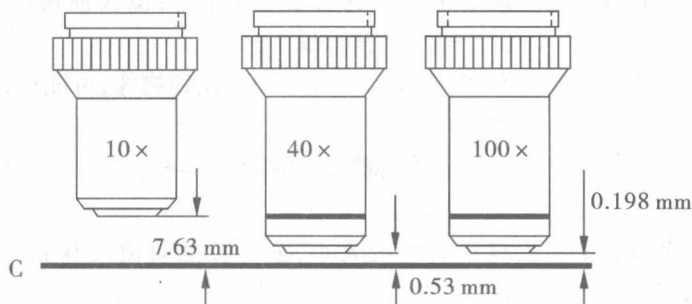


图 1-3 物镜的工作距离和同高调焦

三、操作练习

1. “a”字母装片 取装片肉眼观察“a”字母形态,然后置于载物台,先在低倍镜下观察,比较视野内所见“a”字母和肉眼所见的“a”字母形态有何不同;轻轻将玻片前后左右移动,看物像与玻片移动方向是否一致;对此,该如何解释? 将“a”字母的字头或字尾移至低倍镜视野中央,然后转换高倍镜观察。

2. 血涂片 先用低倍镜找出红细胞分散均匀的地方,移至视野中央,然后换高倍镜、油镜观察。