

外借

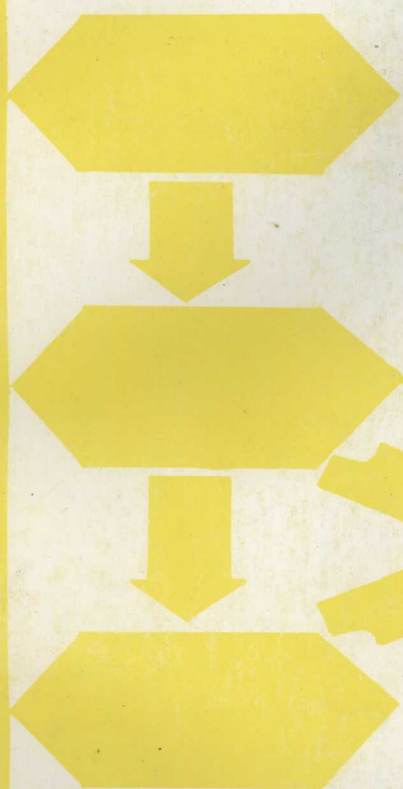
YI XUE SHENG WU XUE

SHI YAN YU XI TI

高等医药院校教材

医学生物学实验与习题

胡继鹰 曹新 主编 · 华中师范大学出版社



鄂新登字 11 号

医学生物学实验与习题

主 编 胡继鹰 曹 新

华中师范大学出版社出版发行

(武昌桂子山)

新华书店湖北发行所经销

湖北省供销学校印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张: 9.50 字数: 243 千字

1993 年 5 月第 1 版 1996 年 11 月第 2 次印刷

ISBN 7-5622-1052-7/R·17

印数: 7001-9000 定价: 10.80 元

本书如有印装质量问题可向承印厂调换

前 言

近年来,高等医药院校的医学生物学课程在教学内容方面进行了较大的改革,无论是理论还是实验,都在不断更新,向较高的水平发展。但同时也出现了明显的分化,许多院校将教学内容集中于细胞和遗传两个部分,更有一些院校将医学生物学分解为医学细胞生物学、医学遗传学二门课或医学细胞生物学、医学遗传学、实验动物学三门课。为了适应当前变化的形势,加强该课程的实验教材建设,提高教学质量和教学效率,我们 11 所院校通过协商,联合编写了这本《医学生物学实验与习题》。

本书分为上下两篇,上篇为实验部分,下篇为习题部分。实验部分共编写实验项目 33 项,分为医学细胞生物学、医学遗传学、实验动物学三个方面,其中医学细胞生物学 19 项,医学遗传学 11 项,实验动物解剖 3 项。所有实验都突出了实用性、科学性和先进性,集理论与实践、经验与创作于一体,能较好地满足于教学的需要。习题部分的编写目的是为了提高学生高效率地掌握本门课程的基本理论和基础知识,同时也缓解该课程学时少、内容多的矛盾。根据目前的教学实际,习题只设计了医学细胞生物学和医学遗传学两章。实验和习题的内容编排顺序主要依据胡继鹰主编的《基础医学细胞生物学》(武汉大学出版社,1995)和杜传书主编的《医学遗传学基础》(第二版)(人民卫生出版社,1995)。本书所反映的知识范围除了上述两书外,也涉及宋今丹主编的《医学细胞生物学》(人民卫生出版社,1993)、李璞主编的《医用生物学》(第四版)(人民卫生出版社,1995)以及目前已出版并正在使用的有关教材。

参加本书编写的有 11 所院校的 10 余位老师,他们是胡继鹰、潘克英、冯秋珍(湖北中医学院)、曹新、曹云、卢菲(新疆石河子医学院)、杨保胜(河南新乡医学院)、王郑选(福建中医学院)、刘慧芬(张家口医学院)、霍满鹏、王文强(延安医学院)、孙非(白求恩医科大学)、张开祥(北京中医药大学)、陈月甘、蔡巧青(海南医学院)、骆传祖(鄢阳医学院)、李红枝(广东药学院)。其中书稿的设计、审定、制图等工作由胡继鹰完成。

在本书的编写过程中,始终得到了许多同行的热情鼓励及支持,同时得到了参编院校教务部门及华中师范大学出版社的大力协助,在此表示衷心感谢。

由于编写本书时间仓促,加上作者水平所限,书中一定存在许多不妥之处,希望广大读者在使用时予以批评指正。

编 者
一九九六年十月

目 录

上篇 实验部分

医学生物学实验规则.....	1
----------------	---

I. 医学细胞生物学实验

实验一：光学显微镜的结构和使用.....	2
实验二：细胞内糖原、蛋白质及核酸的显示.....	7
实验三：酶的活性测定及细胞内显示	10
实验四：细胞的基本形态结构与显微测量	14
实验五：细胞膜的通透性试验	17
实验六：细胞的吞噬活动观察	19
实验七：光镜切片标本的制作	20
实验八：细胞器的光镜观察	23
实验九：电子显微镜样本的制备	27
实验十：半薄切片和超薄切片	29
实验十一：电子显微镜的结构和使用	32
实验十二：细胞器电镜图片观察与分析	36
实验十三：动物骨髓细胞染色体的制备及观察	38
实验十四：细胞有丝分裂的制片及观察	41
实验十五：细胞减数分裂的制片及观察	44
实验十六：显微摄影技术	47
实验十七：细胞培养及培养细胞的冻存与复苏	52
实验十八：培养细胞的观察、计数及活力测定	55
实验十九：细胞融合	57

II. 医学遗传学实验

实验二十：人体外周血淋巴细胞培养及染色体制备	59
实验二十一：人类染色体组型分析	61
实验二十二：人类染色体 G 带制片及分析	64
实验二十三：人类染色体高分辨 G 带标本制备	66
实验二十四：人类异常核型的观察和分析	69
实验二十五：人类性染色质的制片与观察	71
实验二十六：微核测定	74
实验二十七：姊妹染色体交换 (SCE) 试验	75

实验二十八：核仁形成区的银染显示及观察 77

实验二十九：人类某些正常遗传性状的调查分析 78

实验三十：人类皮肤纹理观察与分析 81

Ⅲ. 实验动物解剖

实验三十一：蟾蜍（或青蛙）的解剖 85

实验三十二：大白鼠的解剖 89

实验三十三：家兔的解剖 95

动物解剖基本知识简介..... 102

下篇：习题部分

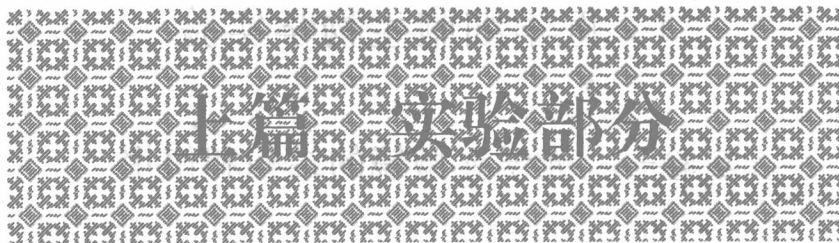
习题体例及说明..... 105

第一章 医学细胞生物学..... 107

第二章 医学遗传学..... 128

多选题参考答案..... 143

主要参考文献..... 145



医学生物学实验规则

医学生物学实验是医学生物学课程的重要组成部分之一。是验证理论、培养学生科学研究能力，进行基本技能训练的主要手段。为保证实验教学的效果，特制订如下规则。

第一条：实验课前，学生应认真预习实验内容，明确每次实验的目的，熟悉每次实验所使用的药品和仪器设备，并掌握其操作程序，如有疑问，操作前必须请教指导教师。

第二条：学生应携带实验课要求携带的物品，如教材、实验报告纸、绘图工具等。需要办理仪器借用手续（如显微镜）的，应在课前提前办理。

第三条：在实验室内应严格遵守纪律，不得大声喧哗、谈笑，不得随意拆卸仪器，搬弄标本、模型。不得在有标签的试剂瓶、标本上涂字、乱划，以免造成错误，引起严重后果。

第四条：要严格按照实验指导和教师讲授的方法步骤进行实验操作，不得颠倒顺序。药品试剂在使用前要核对标签，以免发生错误。

第五条：实验中要注意观察分析实验过程、结果，独立思考解决实验中的问题，如遇确不能自行解决的困难，再请教指导教师和邻近的同学。

第六条：要爱护公有财产，珍惜仪器、标本、器材及药品，如有损失，应立即报告指导教师并按规定接受处理。严禁将实验用具带出实验室。

第七条：注意实验室清洁卫生，实验废弃物应放或倒到指定的地方和容器中。每一同学都要服从卫生值日安排，认真负责地做好实验室清洁。

第八条：要注意安全。对电器要谨慎使用，对有毒、有害的药品要防止与身体的直接接触，特别防止入口、入眼。离开实验室时，应注意关水、关门、关窗、关电。

I. 医学细胞生物学实验

实验一 光学显微镜的结构和使用

【实验目的】

1. 熟悉光学显微镜的结构。
2. 了解显微镜的成像原理。
3. 正确掌握显微镜的使用方法。

【实验原理】

光学显微镜是生物学研究中的常用仪器，是观察微小生物及细胞结构的基本工具。同时，也广泛应用于医学基础研究、临床检验及其他有关方面。显微镜发明于16世纪，17世纪开始应用于生物学领域。几百年来，经过不断改革，其分辨率不断提高，目前使用的复式显微镜放大倍数已达到1600倍，最大分辨率可达 $0.2\mu\text{m}$ 。但受镜口率（最大为1.4）和可见光波长（最短为 $0.4\mu\text{m}$ ）的影响，光学显微镜的放大倍数受到了局限。光学显微镜是根据光学原理，采用一组玻璃透镜制作而成（图1-1）。外来光线由其中的反光镜和聚光镜将光线聚集在被观察的标本处，使标本明亮。当光线透射标本进入物镜后，经半五角棱镜，光轴被倾斜 45° ，然后被场镜会聚。此时位于物镜物方焦点之外的标本被物镜放大成倒立的实像。在目镜的物方焦点B-B'上，该像经目镜进入人的眼睛，在视觉上得到一个放大的虚像并定位于无穷远或明视距的250mm外，成为显微镜的观察图像。

【实验用品】

1. 器材：显微镜、载玻片、盖玻片、擦镜纸、纱布。
2. 标本、试剂：血涂片、毛发交叉片、字母装片、香柏油（或石蜡油）、二甲苯。

【内容和方法】

一、显微镜的基本结构与性能

普通光学显微镜外形因生产厂家与型号的不同稍有差异。但基本结构相同，现以图1-2所示，将显微镜作如下分解说明。

（一）机械部分

1. 镜座：是显微镜的底座，以支撑整体的结构，底座较重，有稳定作用。
2. 镜柱：是与镜座垂直相连的短柱。
3. 镜臂：镜柱上方倾斜部位，其支持连接镜筒，也是握拿显微镜的部位。
4. 镜筒：在整体的最上端，是一个圆筒状结构，有目镜套入其内。
5. 单筒镜座：在镜筒下方一个底为近方形，上面有前后各为倾斜面的装置，在左下方有一旋钮，拧紧后以固定镜筒位置。
6. 载物台（平台）：与镜柱相垂直连结的黑色方形台，为玻片标本放置处，中央有一透光孔。

(2) 细调节器：转动时，其升降与粗螺旋保持同步一致，但升降位移缓慢，适用于高位镜及油镜或低倍镜调整清晰时使用。有时需观看标本的不同层次时也可使用。

(3) 粗调节器松紧调节轮：在左或右侧粗调节轮内侧，靠近镜柱处，向外转时，可使调节轮旋转时偏紧；向后转动时，粗调节轮转动偏松。

(4) 粗调限位环凸柄：在右侧粗调节轮内侧的一短柄环，当粗调至物像清晰后，把限位凸柄向前推紧，粗调即可限位，平台不能再上升。但不妨碍细调。

(有的显微镜缺少(3)和(4)结构。)

10. 物镜转换盘：为一凸形圆盘，位于镜筒下方，其下有3~4个物镜孔，可安装不同放大倍数的物镜。调看不同放大倍数的物镜时，可用手指相对按紧转换器上的齿痕旋转此盘，换取所需放大倍数的物镜。

盘内有一“T”形卡，而每个物镜孔外侧边缘有一缺刻，用以对准位置和固定，使物镜和光轴同心。

(二) 照明部分

1. 反光镜：位于底座中央的一个圆形镜面，镜面可分为平、凹两面。镜框由万向接头连接，因此可任意调至各种不同方向与角度。反光镜能将光线反射进聚光镜。当光源较强时，采用平面镜反射；凹面镜有聚光作用，适用于光线较弱或日光灯等散射光的场所。

2. 聚光器：位于载物台透光孔下方，由一组透镜组成，可使反光镜反射上来的光线集中于标本上，以增加亮度。其左方有一螺旋，转动时可使聚光器起升降作用。上升时光线增强；下降时则光线减弱。

3. 光圈(光阑)：在聚光镜下方，由一组金属片组成，右外侧有一小柄，拨动时可使光圈扩大或缩小，以调节光亮度。光圈下方尚有一滤光片圆环，可放置各种颜色的滤光片。

(三) 光学部分

1. 目镜：套在镜筒上端的短圆筒状物，其上刻有10×或15×等符号，表明目镜的放大倍数为10或15倍。低倍镜筒比高倍镜筒长。

一般实验室在购置显微镜后，往往在镜筒内粘上一小段头发(或细铜丝)作为观察时的物象指针，因此在视野中可看到一黑线，称为“指标针”，以指明观察目的物的位置。

2. 物镜：根据物镜的放大倍数不同可分为低倍镜、高倍镜和油浸镜(油镜)三种。每个物镜上都刻有相应的标记。N. A. 表示镜口率(孔径数值)。筒身的长短以倍数的增加而增长。

(1) 低倍镜：镜筒上有一圈红色(或蓝色)图纹表示。筒上刻有8×或10×字样，以表示该物镜的放大倍数为8倍或10倍。如以10倍物镜为例，筒上刻有10/0.25和160—。其中0.25为镜口率(N. A. 0.25)；160为160mm的镜筒长度。

(2) 高倍镜：筒身有一圈黄色图纹，并刻有40×或45×字样，以表示该物镜放大倍数。刻有40/0.65和160/0.17，其中0.17为所需盖玻片的厚度为0.17mm。

(3) 油镜：筒身上有一圈白色图纹。刻有90×或100×字样，并刻有100/1.25和160/0.17字样。有的显微镜油镜头直接刻有“油”或“oil”字。从外形上观察，油镜最长，镜孔最小，高倍镜次之，低倍镜最短，镜口最大。

显微镜的放大倍数=目镜的放大倍数×物镜的放大倍数。如低倍镜放大倍数为目镜10×物镜10=100倍，如目镜是16×，那么就是16×10=160倍。

二、显微镜的使用方法

(一) 低倍镜的使用

1. 准备：打开镜箱，用右手握镜臂，取出显微镜，以左手托住镜座，轻轻放于实验台座位正位偏左侧，使镜座距桌沿约 5cm 为宜。

2. 对光：转动粗调节器，使物镜与载物台距离略拉开。转动物镜转换器使低倍镜对准光孔，当听到一声轻微扣紧声时，表示目镜与物镜的光轴一致，打开光圈（从反光镜中可窥视），上升聚光镜。双目齐睁，用左眼向目镜内观察，转动反光镜（一般用凹面镜），约以光源与透光孔成 45° 角度，将聚光镜内反射光线射入视野内，以观察到镜内明亮均匀为止。

3. 放置玻片标本：左手拨动按钮，使弧形夹张开，右手拿玻片（注意使有盖玻片的玻片标本盖玻片面朝上）。转动移动器，使标本移向透光孔中央。

4. 调焦距：先将粗螺旋调至标本与低倍镜相距 0.5cm 处（有的显微镜可以调至最短距离后，不再移动），再慢慢转动粗调节器使平台下降，将距离拉开，这样直到左眼看到物像清晰为止。如第一次因误没有成功，必须从头开始。调焦时，有时因标本不在观察视野以内难以确定焦距是否已调好，此时只要看到物体（如玻片上的尘埃等物），调节移动器，能见到物体移动，即可说明焦距已大致调好。再调移动器，寻找所要观察的标本。

（二）高倍镜的使用

1. 先在低倍镜下找到目的物，将要放大的部分移至视野中央。

2. 从侧面注意物镜，转动转换器，使高倍镜对准透光孔。

3. 从目镜观察，一般配套较好的显微镜，即可看到模糊的目的物，此时工作距离（物镜与标本之间距离）有可能已超过（过近）或不够（过远），只需轻轻转动细调节器，即可得到清晰的图像。如找不到图像，可能有下列几种原因：

（1）被观察的目的物不在视野中央，需从低倍镜中移至中央再转换高倍镜。

（2）标本色浅，光太强，应缩小光圈（或降低聚光镜），减弱光源射入。

（3）标本片放反了，使观察标本与物镜间相距一个载玻片距离，应将玻片翻面后调焦观察。

（4）有的低倍镜看到标本后，转动高倍镜碰到片子，首先可能是玻片放反，也可能是低倍镜或高倍镜没拧紧，造成距离偏差，应拧紧物镜，即可纠正。

如高倍镜本身与低倍镜相距不配套，在低倍下找到后，非上述（3）和（4）的原因，则可拉开距离，把高倍镜对准透光孔后，先调工作距离为最短时，再转动细调节器，直至清晰为止。

如需更换标本，应先转开物镜，取出标本再放置新的。如玻片厚度是统一的，再转入物镜即可观察，不必降低平台，拉开距离，从头做起。

（三）油镜的使用

1. 转开高倍镜，在玻片上（透光孔中央位置）滴一滴香柏油或石蜡油，眼睛注意侧面，转入油镜使油与油镜面连成一个油柱，由于香柏油或石蜡油的折光率分别为 1.515 和 1.46，与玻璃的折光率 1.52 相近（空气为 1），故可以减少光的折射，增加标本观察的亮度。

2. 慢慢上下调节细螺旋，必要时调节光圈和聚光器以增加镜内亮度，直到目的物清晰为止。

3. 油镜使用后，先拉开镜头与平台的间距，并把镜头转向一侧，用擦镜纸把镜头上的油擦干净，再用擦镜纸沾少许二甲苯轻擦，最后用干净擦镜纸擦干净。无盖玻片的玻片如血涂片、染色体滴片（未加盖片封固者）则不能擦洗，以免损坏标本。

（四）低倍镜和高倍镜的使用练习

1. 观察血涂片。由于血涂片一般是用瑞氏染液染色，呈蓝紫色，因此只需把有颜色的对准透光孔，即可找到血细胞。

2. 观察毛发交叉装片。由于毛发交叉的观察面比血涂片小，不易找到，因此要熟练掌握调焦距后，才能将交叉点置入镜下。方法是先用低倍镜找到头发交叉，移到中央，再转换高倍镜观察。

3. 观察字母装片。先用低倍镜，再转高倍镜，注意字母的倒像。

(五) 油镜的使用练习

取血涂片（或自制血涂片）置于镜下，先用低倍镜找到细胞，换入高倍镜观察，再用油镜观察。注意油不要滴得太多，一般仅需一滴。

三、几种特殊用途的光学显微镜简介

1. 双筒解剖镜：为一种单式显微镜，有反光镜（或无），有两个目镜（可有几个不同倍数目镜更换）及几个物镜（不同倍数），放大倍数低者仅2~3倍，高者可达200倍。此种显微镜所得物像是具有立体感的实体正像，可在镜下进行细小生物的解剖。

2. 荧光显微镜：荧光显微镜的光源是紫外光（波长365nm）或短光波的蓝紫色光（波长420nm）作为激发光源，激发标本内的荧光物质，使呈现荧光映像。有些物质需经荧光染料染色后才能发出荧光。荧光显微镜还装有两种滤片：①激发滤片装在光源与显微镜之间，它可吸收可见光，仅使短波的蓝紫光 and 紫外光等不可见光通过；②阻断滤片装在物镜和目镜之间，可吸收视野内多余的短光波，保护使用者的眼睛。

3. 相差显微镜：相差显微镜是靠装在物镜内的相位板，使直射光和绕射光发生干涉，改变光的相位，转换成振幅差（明暗差）。它又具有正反差和负反差两种装置，前者又称暗反差，使背景明亮标本暗；后者是背景暗标本明亮。两者都可造成清晰的对比，便于分辨活体标本和未经染色的标本的各种结构。

4. 倒置显微镜：倒置显微镜的物镜位于标本的下方，而光源位于标本的上方。主要用于细胞培养（尤其是贴壁培养）时观察培养瓶中的细胞的生长情况。

5. 暗视野显微镜：暗视野显微镜是用来观察活体微小生物或生活细胞的显微镜，它可以用普通光镜改装而成。其特殊结构是在聚光器上加上一块中央遮光板，或直接使用暗视野集光器，这样使光源的中央光束不能通过聚光镜的中心部位透入物镜，而是倾斜的照射在观察的标本上，经标本反射而投入到物镜中，这样，视野是暗的，被观察标本则是暗视野中的亮点，其优点是能比较方便的观察活体的细胞或微小生物如螺旋体的运动情况，其缺陷是不能观察物体的内部结构。

【注意事项】

1. 取显微镜时应轻拿轻放，切勿一只手斜提，使镜头或其他零件脱落。

2. 观察玻片上有液体的临时装片时，要加盖玻片，以免水与镜头接触，使镜头受湿日久霉变。

3. 人的单眼观察，往往因人而异，有的人右眼是主眼；有的人左眼是主眼，好像右利手和左利手（左撇子）一样，因此当你是习惯用右眼的，必须更改为左眼观察，如两眼睁开看不习惯，可先用手挡住右眼，等左眼看清后，再逐渐放开右眼，反复练习，直至能双眼齐睁，左眼观看，这样有利于绘图且眼睛不累。

4. 不要随便取出目镜，以免灰尘落入镜筒内，影响观察和损坏显微镜。

5. 镜下的视野是一个圆面形，好似一个“钟”面，有某方位不能确定是何物时，以钟面

所示方向,如“11”点或“3”点钟方向向教师提问,这样比所讲左上角或右上角所示方便。

6. 切忌将弧形标本夹自行收回,以免回缩过猛将玻片弹出。

7. 使用完毕,检查玻片取出否,再把镜头转开,不要使其对准透光孔。同时将反光镜垂直于镜座,以免积灰,然后放回原处。显微镜带有绸布的应用绸布将显微镜包扎好,有木箱的应将显微镜放入木箱。

【实验报告与思考题】

1. 填图注明显微镜各部分的名称。
2. 三种物镜有何不同,如何区别?
3. 为什么使用高倍镜或油镜时要从低倍镜开始?
4. 当低倍镜下找到目的物后,转入高倍镜时找不到,应从哪些方面寻找原因?如何使用油镜?
5. 观察字母片时,字母是正像还是反像?移动玻片时,物像与玻片的移动方向是否一致?为什么?

实验二 细胞内糖原、蛋白质及核酸的显示

【实验目的】

1. 熟悉糖原、蛋白质、核酸在细胞内的主要存在部位。
2. 了解细胞内糖原、蛋白质、核酸显示的原理和方法。
3. 进一步掌握显微镜的使用方法。

【实验用品】

1. 器具:显微镜、载(盖)玻片、刀片、小镊子、解剖剪刀、染色缸、染色架。
2. 材料、标本:土豆、洋葱、肝糖原切片。
3. 试剂:革兰氏碘液、5%三氯醋酸、固绿染液、甲基绿·派洛宁染液、Carnoy 固定液、酒精、丙酮。
4. 动物:蟾蜍。

【内容和方法】

一、糖原、淀粉的显示

(一) 原理

糖原和淀粉是生物有机体生命活动能量的主要来源。淀粉是一种植物性多糖,贮藏于植物的种子、块茎、块根中。淀粉遇碘呈蓝色反应,这是由于碘被吸附在淀粉上,形成一复合物—碘化淀粉之故。碘化淀粉是不稳定的,极易被醇、氢氧化钠和热分解,因而使颜色褪去。其他多糖大多能与碘呈特异的颜色反应,这些呈色物质亦不稳定。糖原又称动物淀粉,是动物细胞内贮藏能量的多糖类物质。在肝脏中尤为丰富。可用过碘酸雪夫试剂反应(Periodic Acid Schiff reaction),简称PAS反应进行检测。含乙二醇基的多糖类在高碘酸的作用下氧化而产生双醛基,醛基进而与Schiff氏液反应,使其中的无色品红变成紫红染料而附于含糖的组织上,着色的部分即为肝糖原。

(二) 试剂配制

革兰氏碘液：称碘化钾 1g，溶于 50ml 蒸馏水中，再加 0.5g 碘使溶解。最后用蒸馏水稀释至 150ml，盛于棕色瓶内，保存暗冷处。

(三) 方法

1. 淀粉

(1) 马铃薯徒手切片。

(2) 取一薄片放在载玻片上，用吸管吸取革兰氏碘液一滴于马铃薯薄片上，盖上盖玻片。

(3) 置光学显微镜低倍镜下观察。可见在多角形的薄壁细胞中，有许多椭圆形蓝色的颗粒，即淀粉粒。

2. 糖原：在光镜下观察肝糖原切片 (Schiff 氏反应肝组织切片)，可见肝细胞略呈多角形，中央有 1~2 个染成蓝色圆形的细胞核。在细胞质中可见许多紫红色的小颗粒，即为肝糖原 (图 2-1)。

二、细胞内酸性蛋白和碱性蛋白的显示

(一) 原理

蛋白质的基本组成单位是氨基酸，是两性电解质。随着溶液 pH 值的不同，蛋白质可离解为正离子、负离子或两性离子，如果在某一 pH 值时，蛋白质颗粒上所带的正、负电荷总数相等，在电场中即不向正极也不向负移动，这时溶液的 pH 值即为该蛋白质的等电点。由于蛋白质的游离基团除了末端氨基和末端羧基外，还具有许多侧链，其上许多基团在溶液中也都可以电离，因此，一个蛋白质分子表面四周都有电荷。不同蛋白质分子所带有的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不等，故它们的等电点也不一样。因此蛋白质分子所带的净电荷既受所在溶液的 pH 值影响，也取决于蛋白质分子组成中碱性氨基酸和酸性氨基酸的含量。在生理条件下，整个蛋白质带负电荷多，为酸性蛋白质 (等电点偏向酸性)，带正电荷多，为碱性蛋白质 (等电点偏向碱性)。据此，用不同 pH 值的固绿染液 (一种弱酸性染料，本身带负电荷) 对细胞中的蛋白质染色，可使细胞内的酸性蛋白和碱性蛋白分别显示。

(二) 试剂配制

1. 5% 三氯醋酸液：称取 2.5g 三氯醋酸溶于 50ml 蒸馏水中。

2. 染色液

(1) 三种母液 (实验前配制)

A: 0.2% 固绿染液：取 0.2% 固绿溶于 100ml 蒸馏水中。

B: 1/75mol/LHCl (稀释一倍后 pH=2.0~2.5)：取 12mol/L 的浓盐酸 0.11ml 加入到 98.89ml 蒸馏水中混匀。

C: 0.05% 碳酸钠溶液 (稀释一倍后 pH=8.0~8.5)：称取 50mg 碳酸钠 (Na_2CO_3) 溶于 100ml 蒸馏水中。

(2) 二种蛋白质染液 (实验时混合)

甲液：0.1% 酸性蛋白固绿染液：母液 A+B (1:1)，即为 0.1% 酸性固绿染液。(1/150mol/

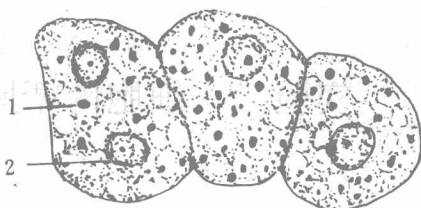


图 2-1 肝细胞的糖原

1. 糖原颗粒 2. 细胞核

L HCl, pH=2.0~2.5)。

乙液：0.1%碱性蛋白固绿染液：母液 A+C (1:1)，即为 0.1%碱性固绿染液 (0.025% Na_2CO_3 , pH=8.0~8.5)。

(三) 方法

1. 取材与涂片：将蟾蜍用乙醚麻醉后，剪开胸腔，打开心包，小心地在心脏上剪一小口，取心脏血一小滴滴在干净载玻片右端，另取一边缘光滑平齐的玻片作为推片制作厚薄适中的血涂片。制成的涂片室温晾干。每个同学制血涂片二张，并做好标记。

注意：①取血滴不宜太大，以免涂片过厚，影响观察。②要使涂片厚薄适中。注意拿片姿势，推片角度和速度要适中，要用力均匀。③涂片一般在后半部观察效果较好。

2. 固定：将晾干的涂片浸于 70%乙醇中固定 5 分钟，取出后，室温下晾干。

3. 三氯醋酸处理：将已固定的血涂片浸于 5%三氯醋酸中 60℃温度处理 30 分钟。取出后用清水冲洗 3 分钟以上（注意一定要反复洗净，不可在涂片上留下三氯醋酸痕迹。否则酸性蛋白和碱性蛋白的染色不能分明）。然后用滤纸吸干玻片上的水分。

4. 染色和镜检：将显示酸性蛋白的涂片放入 0.1%的酸性固绿溶液中染 5 分钟至 10 分钟，清水冲净，晾干。将显示碱性蛋白的涂片在 0.1%碱性固绿染液中染 0.5~1 小时（视染色深浅而定），清水冲净，晾干。分别镜检。

5. 观察结果：用 0.1%的酸性固绿染液染色处理过的蟾蜍红细胞质和核仁中蛋白质均被染成绿色，此即酸性蛋白在细胞内的分布，而胞核内染色质部分并不染上色（但时间太长可能染上色）。经 0.1%的碱性固绿染液染色处理的标本中，只有细胞核内染色质部分被染成绿色，此即碱性蛋白在细胞内的分布，而胞质及核仁不着色。

三、细胞内 DNA 和 RNA 的显示

(一) 原理

早年曾用甲基绿·派洛宁 (Methylgreen-Pyronin) 作为一般的组织学染色。后来用核酸水解酶 (RNase 和 DNase) 作为“酶水解对照”研究，证实甲基绿所染者为 DNA，可被脱氧核糖核酸酶 (DNase) 消化而特异性失染。派洛宁所着色者为 RNA，可经核糖核酸酶消化使原派洛宁阳性物质失染。从而使甲基绿·派洛宁染色成为一种显示核糖核酸的组织化学方法。甲基绿染 DNA 和派洛宁染 RNA 不是化学作用，而是与 DNA 和 RNA 聚合程度、对碱性染料有不同的亲和力有关。甲基绿分子上有两个相对的正电荷，它对聚合程度高的 DNA 有强的亲和力，故可使分布在胞核中的 DNA 被染成蓝色或绿色；而派洛宁分子上只有一个相对的正电荷，它仅和聚合程度较低的 RNA 相结合，使分布于胞质和核仁中的 RNA 染成红色。

(二) 试剂的配制

1. 2%甲基绿染液：称取 2g 去杂质甲基绿粉溶于 0.2mol/L 的醋酸缓冲液 100ml 中。

甲基绿粉中往往混有杂质甲基紫，此杂质可影响染色效果，必须预先除去。除去甲基紫杂质的方法是：将甲基绿粉溶于蒸馏水中，放在分液漏斗中加入足量的氯仿（三氯甲烷），用力振荡，然后静置，弃去含甲基紫的氯仿，再加入氯仿重复数次，直至氯仿中无甲基紫为止，最后放入 40~45℃温箱中干燥后备用。

2. 5%派洛宁染液：称取 5g 派洛宁（吡罗红）溶于 100ml 0.2mol/L 的醋酸缓冲液中混匀。

3. 甲基绿·派洛宁染液：A 液：5%派洛宁染液 17.5ml，2%甲基绿染液 10ml，蒸馏水 250ml。

B 液：0.2mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.8)：0.2mol/L 醋酸 4 份 (1.2ml 醋酸加蒸馏水至

100ml), 0.2mol/L 醋酸钠溶液 6 份 (2.7g 醋酸钠 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 加蒸馏水至 100ml)。

使用液: 将 A、B 二液等量混合即成。该液应现配现用, 不宜久置。

4. Carnoy 固定液: 无水乙醇 6 份, 氯仿 3 份, 冰醋酸 1 份。使用前现配。

(三) 方法

1. 洋葱表皮细胞 DNA、RNA 的显示

(1) 切开洋葱鳞茎, 用镊子轻轻撕下洋葱鳞片的内侧面膜状的半透明内表皮, 用剪刀剪下一小块 (约 4mm^2 大小) 置于玻片上。

(2) 用吸管吸取甲基绿·派洛宁染液滴一滴于洋葱表皮上, 染色 30~40 分钟。

(3) 用吸管吸取一滴蒸馏水冲洗表皮, 并立即用吸水纸吸干, 因为派洛宁易脱色。

(4) 盖上盖玻片, 置显微镜下进行镜检。可见细胞质和核仁呈淡红色或红色, 表明其含 RNA, 而核质呈蓝色, 表明其含有 DNA。

2. 蟾蜍血涂片 DNA、RNA 的显示

(1) 制备蟾蜍血涂片。

(2) 固定: 将晾干的涂片浸于 Carnoy 氏液中固定 10~30 分钟。

(3) 80% 酒精浸洗 2~3 分钟。

(4) 蒸馏水洗数次 (每次 1~2 分钟), 晾干。

(5) 染色: 将血涂片平放在染色架上, 用吸管吸取甲基绿·派洛宁染色液数滴于血标本上, 染色 10~20 分钟。

(6) 冲洗: 用蒸馏水冲洗, 除去片上的浮色, 并用滤纸吸干多余的水分。

(7) 分化: 将血涂片浸入纯丙酮中分化片刻, 取出晾干。

(8) 中性树胶封固或直接镜检。光镜下可见细胞核呈绿色, 细胞质呈淡红色。

【实验报告及思考题】

1. 绘图说明洋葱鳞茎表皮细胞内 DNA 和 RNA 的分布或蟾蜍红细胞内酸性蛋白及碱性蛋白的分布。

2. 扼要说明细胞内糖原、蛋白质及核酸显示的原理。

实验三 酶的活性测定及细胞内显示

【实验目的】

1. 了解唾液淀粉酶的活性测定的原理及方法。

2. 了解细胞内碱性、酸性磷酸酶的分布。

3. 了解过氧化氢酶在细胞内的分布。

【实验用品】

1. 材料、标本: 土豆、血液、唾液、洋葱。

2. 动物: 大白鼠。

3. 器具: 刀片、棉球、载玻片、温箱、解剖刀、剪。

4. 试剂: 革兰碘液、固定液、孵育液、2% 硝酸钴、1% 硫化铵、甘油明胶封固剂、2% 甲基绿染液、丙酮、酒精、0.5% 硫酸铜、3% 过氧化氢、0.1% 联苯胺、1% 番红。

【内容和方法】

一、唾液淀粉酶的活性测定

(一) 原理

唾液淀粉酶存在于人或高等动物的唾液中，能将淀粉分解为麦芽糖。淀粉遇碘呈蓝色反应，而麦芽糖遇碘不显色。

(二) 方法

1. 将口漱净。
2. 用吸管滴一滴食用醋在舌尖上，使唾液分泌。
3. 将消毒棉球含入口中，待棉球湿透后取出，置于小烧杯中，用少量水稀释。
4. 用刀片刮取煮熟的土豆少许，分别置于载玻片的两端。
5. 用吸管吸取稀释唾液一滴滴于载玻片的一端的土豆上，再用另一吸管吸取蒸馏水一滴滴于载玻片另一端的土豆上，静置 15~20 分钟。

(三) 结果观察

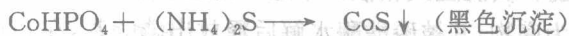
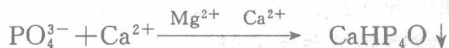
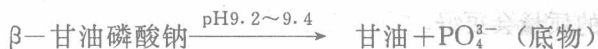
在载玻片的两端再分别加碘液一滴，观察两端的颜色反应。结果为加稀释唾液的一端不显色，说明淀粉在唾液酶的作用下已分解，而加蒸馏水的另一端呈蓝色，未被分解。

若将唾液煮沸，重复上述实验，结果两端均呈蓝色，这是由于酶的活性受热的作用而被破坏，已无分解淀粉的能力。

二、细胞中碱性磷酸酶的显示

(一) 原理

磷酸酯酶能分解磷酸酯，当含有磷酸酯（如甘油磷酸钠）的作用底物与磷酸酶一起保温时，磷酸酯被磷酸酶水解后释放磷酸基，在 pH9.2~9.8 的条件下，磷酸基和钙盐起作用，形成磷酸钙，磷酸钙是无色的，若把它变成磷酸钴，再和钴化物、黄色硫化铵作用，就会形成黑色沉淀的硫化钴了。



(二) 试剂配制

1. 固定液：冷丙酮或 95% 酒精。
2. 3% β -甘油磷酸钠：称取 β -甘油磷酸钠 3g 溶于 100ml 蒸馏水中。
3. 2% 巴比妥钠：称取 2g 巴比妥钠加入到 100ml 蒸馏水中。
4. 2% CaCl_2 ：称取无水 CaCl_2 2g 溶于 100ml 蒸馏水中。
5. 2% MgSO_4 ：称取硫酸镁 (MgSO_4) 2g 溶于 100ml 蒸馏水中。
6. 孵育液 (pH9.2~9.4)：3% β -甘油磷酸钠 5ml，2% 巴比妥钠 5ml，蒸馏水 10ml，2% CaCl_2 10ml，2% MgSO_4 1ml，混匀。
7. 2% 硝酸钴：称取 2g 硝酸钴溶于 100ml 蒸馏水中。
8. 1% 硫化铵：量取 1ml 硫化铵加入到 99ml 蒸馏水中。现配现用。
9. 甘油明胶封固剂：称取明胶 7g 加入 42ml 蒸馏水中，水浴加温溶解，再加入 500ml 甘油并搅匀，加少许麝香草酚作防腐剂，置 4℃ 保存，使用时水浴加温融化。

(三) 方法

1. 血液涂片的制作：用 75% 酒精棉球消毒手指尖，待酒精干后，操作者以左手把取血手指攥紧，右手用消毒三棱针在取血手指上刺一伤口，深约 2 毫米，以干棉球擦去第一滴血，轻按取血手指待血流成滴，沾一滴血在干净载玻片右端，另取一边缘光滑平齐的玻片作为推片。玻片与载玻片约成 30~45° 角，并与血滴接触，使血滴向玻片边缘散开，迅速将推片推向左方，做成一均匀和厚薄适中的血涂片。

2. 将新鲜、干燥的血涂片于冷丙酮或 95% 酒精中固定 10~20 分钟。

3. 蒸馏水洗数次，每次约 1~2 分钟。

4. 入孵育液中，37℃ 孵育 4~6 小时（孵育液现用现配，用前半小时放入 37℃ 温箱中）。

5. 自来水冲洗数次。

6. 2% 硝酸钴中浸 3~5 分钟。

7. 蒸馏水洗数次。

8. 1% 硫化铵中 2 分钟。

9. 自来水冲洗。

10. 2% 甲基绿复染 10~15 分钟，流水冲洗。

11. 晾干，封固：向玻片标本上滴加 1~2 滴明胶甘油封固剂，再覆盖上一张盖玻片，置 37℃ 温箱中，待固定后镜检。

(四) 结果观察

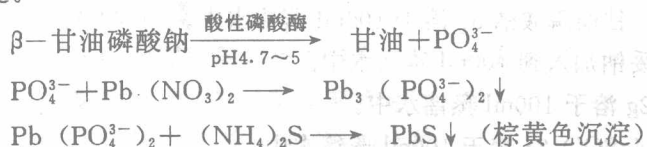
将制备好的标本置于光镜下。正常人血液的碱性磷酸酶主要呈现在中性粒细胞，其他成分如嗜酸、嗜碱、淋巴、单核以及巨核细胞、血小板和浆细胞等均为阴性反应。在高倍镜下可见阳性反应呈现灰黑以至深黑颗粒状或片块状沉淀，定位于胞质中，色深者表示酶多。对照片无酶反应。对照片是孵育液中以 10ml 蒸馏水代替甘油磷酸钠，其他相同。

本实验材料还可用盖片培养的单层细胞或洋葱表皮细胞，用这些材料做成的片子在封固之前，如经过脱水、透明处理，标本片的质量会更好。

三、细胞中酸性磷酸酶的显示

(一) 原理

酸性磷酸酶与碱性磷酸酶同属于磷酸酯酶，其反应式相似，不过，钙盐在酸性情况下可被溶解，故在本实验中要改用铅盐。以磷酸酯为底物，其被磷酸酶水解后释放出磷酸基，在 pH5.0 左右就和铅盐结合形成磷酸铅，磷酸铅是无色的，须再经过硫化铵使其变成棕黄色的硫化铅沉淀。



(二) 试剂的配制

1. 固定液：冷丙酮或 95% 酒精或福尔马林。

2. 0.05mol/L 醋酸缓冲液 (pH5) 配制：醋酸 0.6ml 加蒸馏水 200ml，取其 42ml；醋酸钠 1.36g 加蒸馏水 200ml，取其 158ml。两者混和即为 0.05mol/L 醋酸缓冲液 (pH5)。

3. 5% Pb(NO₃)₂ 的配制：称取硝酸铅 5g 溶于 100ml 蒸馏水中。

4. 孵育液的配制：0.05mol/L 醋酸缓冲液 (pH5) 12ml，5% Pb(NO₃)₂ 水溶液 2ml，3%