

# 细胞生物学实验指导

山西大学生物系

一九八〇年

# 细胞生物学实验指导

## 目 录

前言	一
第一部分 细胞的结构	一
实验1 原核细胞结构及类型	二
一、仪器设备及材料	二
二、化学试剂及配制	二
三、实验内容及程序	二
(一) 光学显微镜下的原核细胞	二
A、细胞形态的观察	二
B、兰藻形态的观察	三
(二) 电子显微镜下原核细胞	三
(三) 细菌的电子显微镜制片方法	三
A、金属网及清洁法	三
B、制膜	三
C、点样	三
D、喷镀	四
实验2 真核细胞结构及类型	四
一、仪器设备及材料	四
二、化学试剂及配制	四
三、实验内容及程序	五
(一) 光学显微镜下的真核细胞	五

A、眼虫观察	五
B、阿米巴观察	五
C、衣藻观察	六
D、集群有机体观察	六
E、多细胞有机体的细胞观察	七
E— a 人腮上皮细胞观察	七
E— b 洋葱表皮细胞的观察	七
E— c 人血细胞的观察	七
E— d 蛙血细胞的观察	九
E— e 蛙精子细胞的观察	九
(二) 电子显微镜下的真核细胞	九
第二部分 细胞的代谢	十
实验3 离体叶绿体制备和希尔反应	十
一、仪器设备和材料	十
二、化学试剂和配制	十一
三、实验内容和程序	十一
(一) 菠菜离体叶绿体悬浮液的制备	十一
(二) 希尔反应 I: 离体叶绿体对染料的还原作用	十一
(三) 希尔反应 II: 依赖于光的波长	十二
实验4 离体线粒体、细胞核的制备、线粒体琥珀酸脱氢酶 活性分析	十三
一、仪器设备和材料	十三
二、化学试剂及配制	十三
三、实验内容和程序	十四

(一) 由生活细胞中分离线粒体	十四
(二) 线粒体和核的识别	十五
(三) 线粒体中琥珀酸脱氢酶分析	十五
(四) 线粒体蛋白质的测定	十六
实验5 离子进入细胞的活性运输	十七
一、仪器设备及材料	十七
二、化学试剂及配制	十七
三、实验内容及程序	十七
(一) 细胞提取液的制备	十七
(二) Mohr 法测定氯化物	十七
第三部分 细胞的繁殖	十八
实验6 小麦根尖细胞有丝分裂过程观察	十九
一、仪器设备及材料	十九
二、化学试剂及配制	十九
三、实验内容及程序	十九
实验7 花粉母细胞减数分裂的观察	二十
一、仪器设备及材料	二十
二、化学试剂及配制	二十
三、实验内容及程序	二十
第四部分 附录	二一
附录一 I 蛙血细胞和精子悬浮液的制备	二一
一、蛙血细胞悬浮液的制备	二一
二、蛙精子悬浮液的制备	二一
附录一 II 电子显微镜技术	二二

一、电子显微镜原理和结构概述	二二
二、生物样品的制备技术	二四
(一) 支持膜的制备	二四
(二) 超薄切片法	二四
三、超薄切片法的实验步骤	二五
(一) 固定液、包埋剂及染色液的制备	二五
(二) 操作步骤	二六
附录一 III 超离心技术	二七
一、原理及计算	二七
(一) 离心力	二七
(二) 沉降系数	二九
(三) 沉降速度	三十
(四) 沉降时间	三一
(五) 沉降系数与物质分子量	三一
二、仪器装置及操作	三一
(一) 离心管	三二
(二) 离心管帽	三四
(三) 转子	三五
(四) 密度梯度及其制备装置	三六

## 前 言

细胞生物学是生物学各专业的一门基础课。它的主要内容是研究和探讨组成生物体基本的结构和功能单位——细胞的生命活动规律。近代科学研究结果表明，无论是原核生物或真核生物，组成它们机体的最基本单位是一个和多个细胞。尽管细胞由于分化而表现出极其不同的形态和机能，但是，在基本结构、组成和功能上却有着本质上的相同方面。在本世纪四十年代以来，随着电子显微镜，冰冻离心技术，X衍射，同位素技术以及组织化学等新技术应用到研究细胞中以来，使人们对细胞的认识有了一个迅猛地发展和深入。尤其是五十年代以后，遗传学，生物化学和细胞学的研究相结合以后，使细胞生物学的研究进展到一个新的阶段——分子细胞学。可见，细胞生物学的发展，是和研究手段的改进有着密切的关系。因此，人们对细胞的认识是依赖于实验手段的不断更新和发展。所以，细胞生物学是一门实验性很强的科学。必需通过实验才能真正比较深入地了解细胞的结构和功能，建立起一个完整的概念。这就是细胞生物学实验的目的和任务。

鉴于本课程是基础课，我们在实验内容的安排上，着重基本知识的了解和基本技能的训练。具体有三个方面的内容：细胞的结构。细胞的代谢。细胞的繁殖。细胞结构分原核细胞和真核细胞，通过光学显微镜和电子显微镜的观察比较，从而认识这两种细胞结构上的差异及其结构各部分形态上的特征。细胞代谢着重了解叶绿体的提取和希尔(Hill)反应活性；线粒体提取及Krebs循环中琥珀酸脱氢酶的活性；间接证明细胞膜在控制物质进出中是一个需能(ATP)的活性

运输。细胞的繁殖主要是观察有丝分裂和减数分裂的各个时期。同时增加了一个附录，使我们对电镜和超离心技术有个基本概念和技术训练。

本实验指导在编写上主要参考 W. De Witt 和 E. Brown 的《Biology of the Cell, Laboratory explorations》一书，以及其他一些资料。可能在某些方面不完全适合我们的条件，请同学们在实验后提出意见，以便修改和增补。

## 细胞生物学实验指导

### 第一部分 细胞的结构

自从电子显微镜从四十年代起应用到研究细胞结构以来，生物学家们把细胞分成两种结构上基本不同的类型，即原核细胞和真核细胞。细菌和兰藻属于前一种类型，而其它生物的细胞则属于真核细胞类型。这两种细胞之间主要差别概括在表1中。

表1·原核细胞和真核细胞的比较

原核细胞	真核细胞
1、通常大小在1—10 $\mu\text{m}$	10—100 $\mu\text{m}$
2、没有明显的核，仅有核区域叫核状体(nucleoid)	核明显，有膜包围着核和核仁
3、DNA 是一条很长的长链大分子。	DNA 和蛋白质，RNA 相结合在一个独特的结构内，叫染

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
|                      | 色体，染色体位于核内在细胞有丝分裂时发生变化。     |
| 4. 没有线粒体或叶绿体。        | 有线粒体或叶绿体（有光合作用的细胞才有）        |
| 5. 内膜，如果出现是由质膜折叠而形成。 | 有胞质膜系统，象高尔基器，内质网，膜囊缚的泡囊和液泡。 |

在这一部分中，我们主要观察和识别原核细胞和真核细胞的结构特点。

### 实验 1 · 原核细胞结构及类型

原核细胞包括细菌和兰藻两个类型。它们在生物进化中都是一些古老的生物。这两种类型的原核细胞之间差别是，细菌中某些具有光合作用的细菌在光合作用中不释放出分子态氧，而兰藻在光合作用中释放出分子态氧。光合细菌的主要色素是细菌叶绿素，而兰藻的主要光合作用色素是叶绿素 a。细菌中某些菌具有鞭毛，而兰藻不具有鞭毛。

#### 一、仪器设备及材料

显微镜（带油镜头），镜油，擦镜纸，载盖玻片，带橡皮头吸管，解剖针，牙签，滴并，吸水纸，双层并，酒精灯，特制玻棒。

供实验用的各种细菌和兰藻。

#### 二、化学试剂及配制

1. 吕氏（Loeffler）美兰染液：美兰



(亚甲兰 Methylene blue) 酒精饱和液 (约 2%) 30 ml,  
0.01% KOH 溶液 (KOH 1% 1 ml 加水 99 ml) 100 ml。  
将两液混合后备用。此液陈旧者效果更好。

### 三、实验内容及程序

#### (光学显微镜下的原核细胞)

##### A、细菌形态的观察

- 1、取一张用碱水洗净并浸没在酒精中的载片，在酒精灯上烧去残酒精，平放在桌上。
- 2、用吸管自老师给的菌液样中吸一小滴菌液，滴放在载片中央，用一特制玻棒将水滴铺开，使成一薄层，风干，或微微加热使干。  
(注意加热时涂片向上，在火焰内通过，速度勿过于快或慢，过多不能使菌体固定在载片上，过慢则玻片温度太高，使细胞形状改变，当手触及载片涂材料背面时，觉极热不能停留即行。细胞中蛋白质在 70°C 以上就能凝固，温度加热合适，细胞凝固后就能贴在载片上。染色后用水冲洗不掉)。
- 3、干燥后的片子，用手拿着在空中摇动 1 分钟使它冷却。将冷却片子平放在桌上，滴数滴吕氏美兰染液，静染 1 分钟。
- 4、染色时间到后，打开水龙头，在载片一端用小水冲洗，载片另一端斜下，以利流水。不要水直冲在涂面上。待涂片上染料被冲去后拿出载片。
- 5、将载片放在二张平摊开的吸水纸上，载片上面也盖三、四张吸水纸，用手指轻稳地轻轻按摩吸水纸，使吸水纸吸干载片上残水，切勿使载片移动，以免将涂片滚落。
- 6、将载片拿起在空中摇晃几下，水汽全去后，在涂抹部位加镜油后，可行镜检。

注意被染上颜色的菌的各种形状，绘图表示。

## B. 兰藻形态的观察

在一张清洁干净的载片中央，滴一滴老师准备好的藻液，盖上盖片，在显微镜（400x和1000x）下观察。

在观察中你可能看到好几种兰藻细胞。兰藻有单细胞或群体，细胞壁也不是纤维素，而含氮的粘质复合物，细胞外有胶质分泌物。所以群体兰藻就是靠这种物质把它们粘在一起组成集群。这些集群有呈丝状的，也有呈一团一团的。

粘球藻（*Gloeocapsa*）是一团集群形状，单个细胞之间被凝胶外套彼此粘在一起。而念珠藻（*Nostoc*）则是球形的细胞被粘成长链的丝状体而很多这样长链丝状体嵌入凝胶基质中形成大的肉眼都可见的集群。在丝状体细胞群中，某些部位能看到比较大的透明的异形细胞，这些具有固N的能力，并也能由此处使丝状体断裂。鱼腥藻（*Anabaena*）也有异型细胞，它具有另一种丝状体形态，它的厚壁（*thick wall*）细胞能变成静止（*akinetes*）孢子和孢子（*Spore*）。孢子中含有大量贮藏淀粉，能抵抗环境条件的极度干燥和激烈的变化。

在镜下可能还会看到其它一些藻类。把看到的兰藻绘图表示出来。

## （二）电子显微镜下的原核细胞

将上述光学镜下看到的原核细胞做成电镜样品，再放在电镜下观察，就可以看到在光学显微镜下所看不到的内部超微结构。象细菌中看到细胞壁，质膜，DNA区域，核糖体等。在兰藻中你可以看到除

上述外有类囊体，微粒，多角体，脂肪小滴，聚磷体等。

### (三) 细菌的电子显微镜制片方法

细菌的电镜制片，是把菌体涂抹在火棉胶膜上，火棉胶膜再由一金属网支持，可放在电镜样品室内进行观察。具体操作方法如下：

A、金属网及清洁法：电镜制片金属网为圆形，由铜或不锈钢制成，一般直径3.0—3.5 mm左右。使用前须将网洗涤干净，把网放入醋酸异戊脂中洗去残留火棉胶，再用蒸馏水洗净，尽量沥净残水。然后注入足量的纯浓硫酸，用力摇动2分钟；或用10% NaOH煮沸数分钟亦可。倾去浓硫酸或NaOH并用蒸馏水洗净酸或碱，贮于蒸馏水中备用。

B、制膜：先配制成2%火棉胶溶液（将2 g火棉胶慢慢溶于100 ml醋酸异戊脂中）。可在4—5℃冰箱中保存1个月左右。在一个较大的浅容器（如直径26 mm的大培养皿）内放入干净的蒸馏水，或用醋酸异戊脂饱和过的蒸馏水，水内放撑平的铜丝网（可用绣花用竹绷子撑平）。用干净镊子将电镜用的已洗净的铜网，按一定距离摆在铜丝网上。在水面中央滴一滴2%火棉胶。待扩散成膜后，用镊子将膜取出丢弃，以除去水面的灰尘污物。然后可再滴一滴火棉胶，使形成薄膜。如认为火棉胶膜不合用，如仍有灰尘或小皱纹等可再去除去，重新滴膜。直到形成平展无皱的膜后，轻轻将铜丝网平稳地拿出来，并在无灰尘的条件下温温风干或用红外灯烤干。干后将小铜网（电镜用的铜网）间的膜划开，取出即可点样。

C、点样：在已制备好的菌体悬浮液中，将带膜的金属网在悬浮液中蘸少许菌液，然后放在铺有滤纸的培养皿中干燥之。干后，用显

显微镜检查菌体在膜上的疏密情况。一般菌体间隔4—5  $\mu$ 为宜。

D、喷镀：如果不观察细胞鞭毛可不喷镀。若观察细菌鞭毛，可用以18—28度角度在铜网上喷镀一层铬。然后放在电镜样品室内观察和照像。

## 实验2 真核细胞结构及其类型

不管真核细胞是通过原核细胞有利的突变经过自然选择后的逐渐进化，或共生，或是某些其它机理而发展成为今天的真核细胞的，但当今大多数生物学家都认为所有的真核细胞有机体，它们共同的祖先是来源于一个具有鞭毛的真核生物细胞。随着真核细胞生物的进化，今天人们把真核生物分为四界：即原生动物界包括眼虫，有鞭毛的原生动物，肉足纲和纤毛原虫。植物界包括藻类及其苔藓植物和维管植物。真菌界包括藻菌，子囊菌，担子菌和粘菌类。动物界包括软体，腔肠，海绵，环节，棘皮，节肢和脊索动物。这些真核细胞生物，从简单到复杂千差万别，细胞的类型各式各样，甚至于细胞器的形状也各不相同，但都是真核细胞。

在本实验中，我们将在光学显微镜下和电子显微镜下观察若干代表性类型真核细胞的结构。这些类型中将包括单细胞，集群和多细胞有机体。

### 一、仪器设备及材料

显微镜（10 $\times$ ，40 $\times$ ，及油镜头），镜油，载玻片和盖玻片，擦镜纸，牙签，无菌纱布，刺血针，75%酒精棉球，滴瓶，吸管等。

阿米巴（Amoeba）。衣藻（Chlamydomonas），眼虫

(Euglena)，蛙精液性原细胞(Sperm gonium)，蛙血和人血红细胞。

## 二、试剂及配制

1、甲基纤维素(4%水溶液)。

2、醋酸—地衣红染色液 称取1.5g地衣红(Corcein)溶解在45%100ml醋酸中，充分振荡溶解后，用滤纸过滤，贮于滴瓶中。

3、碘—碘化钾染材(在100ml蒸馏水中溶解2g碘化钾(KI)试剂，然后加入0.2g碘，溶解后贮藏在棕色滴瓶中，注意不要照光以免分解)。

4、赖特(Wright)氏染料(购买商品试剂)。600ml甲醇中溶1g。

5、两栖动物林格(Ringer)氏溶液(将0.66g的NaCl，0.015gKCl，0.015g无水CaCl<sub>2</sub>溶解在100ml蒸馏水中，用固体NaHCO<sub>3</sub>，调整到pH7.8，在酸度计上测量)。

6、哺乳类动物等渗溶液(称0.9g的NaCl溶解到100ml蒸馏水中)。

7、亚甲基兰染料(0.1%水溶液)。

8、亚甲基兰染料(0.1%哺乳类动物等渗溶液)。

9、亚甲基兰染料(0.1%两栖类Ringer氏溶液)。

以上三种染料配制都是称取0.1g亚甲基兰溶于100ml适当的溶剂中，用滤纸过滤后贮于滴瓶中)。

10、二甲苯。

### 三、实验内容及程序

#### (一) 光学显微镜下的真核细胞

制备下列各生活细胞的片子，并在光学显微镜下观察，绘出你所看到的细胞结构，标出它们的准确部位和形状。

##### A. 眼虫 (Euglena) 观察:

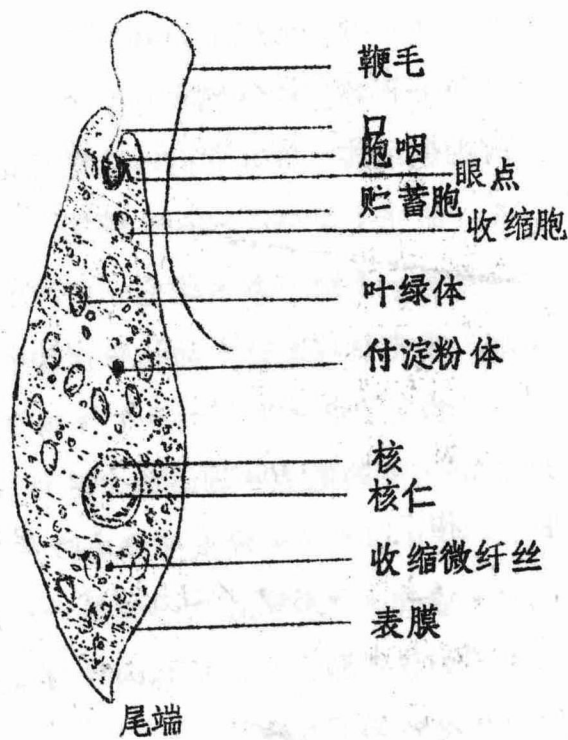
眼虫是一个绿色具有鞭毛 (Flagellum) 和眼点 (Eye-Spot) 的生物。常把说成是介于动物和植物之间的一个类型。因为它具有两种生物结构上的特点 (图-1)。眼虫没有细胞壁，具有高度的游动 (motile) 的能力，通过附加在前面的1—3条鞭毛，可做为推进器 (Prorella)。眼虫有形成的付淀粉粒 (Paramylum) 来贮藏碳水化合物，这种碳水化合物是一种类似葡萄糖的多体，与其说是淀粉，不如说是糖元。眼虫体内含有很多叶绿素能行光合作用，同时又能进行完全的异养生活。

1. 取老师提供的眼虫溶液一滴，放在一张干净的载玻片上，加一滴4%甲基纤维素，用牙签或解剖针稍加混合，以降低眼虫游动力。

2. 盖上盖片，由低倍转高倍镜观察，通过调节光强弱来注意观察鞭毛。并注意观察其它结构部分。

3. 为了清楚观察核和核仁，可在载片一边加上一滴醋酸——地衣红染料，另一边用吸水纸引出溶液，待1—2分钟染色后再作观察。

将观察结果，绘出眼虫的结构图。



图一1 眼虫 (Euglena)

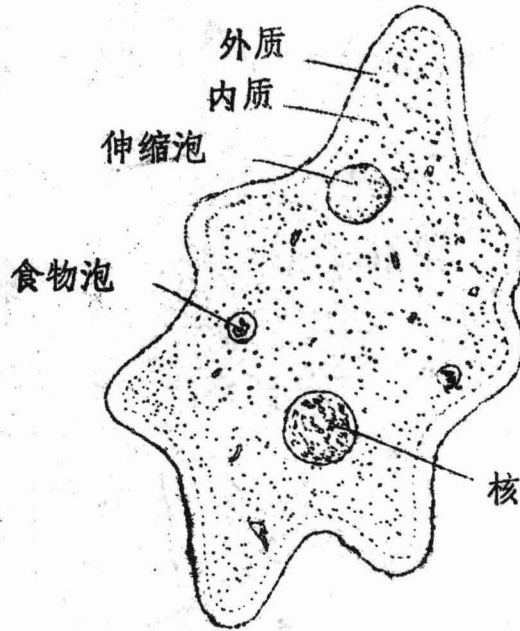
### B. 阿米巴 (Amoeba) 观察

阿米巴是接近于眼虫的另一类原生动物。阿米巴是通过形成伪足 (Pseudopod) 即胞质外伸来运动的。伪足可以捕食食物，形成食物泡，食物泡转向胞质内，被泡内酶消化掉，这种现象叫吞食作用 (Phagocytosis)。(见图一2)

1. 由培养皿底用吸管取阿米巴水液一滴，放在一个干净的载玻片上。不加盖片，放在低倍镜下观察阿米巴伪足(注意用弱光照射)形成和运动，并结合观察它们原生质流动。

2. 加一盖片后放高倍镜下观察阿米巴内部结构。在载片一边加

一滴亚甲基兰水溶液另一边用吸水纸引出溶液，再仔细观察内部构造，并按放大倍数绘图，注明各部分名称。



图—2 阿米巴 (Amoeba)

### C. 衣藻 (Chlamydomonas) 观察

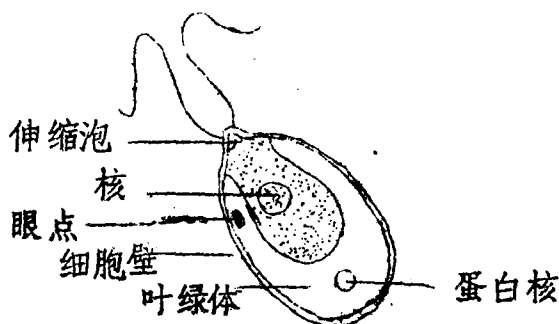
衣藻是带鞭毛的单细胞绿藻。生活在新鲜水中和潮湿土壤中，大量的生化和结构上证据表明，衣藻大概是真核细胞最原始的祖先有机体。衣藻具有一个单一的叶绿体，呈杯状 (图—3)

1. 取一滴衣藻液滴在一张清洁的载片上，加一滴0.4%甲基纤维素液，混合后，盖上盖片。注意观察两条鞭毛，浓缩的细胞质，杯状叶绿体，眼点和核及伸缩泡。并按放大倍数绘出图来。

2. 再取一滴新鲜衣藻液，滴在另一张干净载片上，加一滴I<sub>2</sub>-KI溶液，这种染料特点是将淀粉和蛋白核染色，借此探明叶绿体



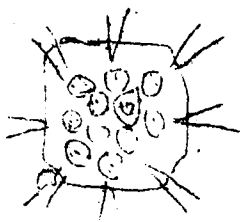
和淀粉形成联系起来。



图—3 衣藻 (Chlamydo-monas)

#### D. 集群有机体 (Colonial Organism) 观察

集群有机体不是一个多细胞生物，而是一个一个的单细胞生物体通过嵌入基质中组成的一个群体。象衣藻组成的性原细胞 (Gonium) (图—4) 就是这样。在群集中，每个细胞具有两个鞭毛，它们可以协调摆动，但个体胞质之间能明显地分清。



图—4 集群性原细胞 (gonium)

1. 取一滴性原细胞放在载片上，加一滴水溶性亚甲基兰染色，并盖上盖片，你会发现集群中各个个体细胞，以及它们漂亮的细胞联接情况。