

细胞生物学 综合实验

主 编 王振英



天津科学技术出版社

细胞生物学综合实验

王振英 主编

天津科学技术出版社

内 容 简 介

本书是一本综合性、实用性细胞生物学实验教材，全书共3篇36个实验，第一篇为基础篇，主要为经典细胞生物学实验和基本方法介绍；第二篇为应用篇，主要涉及基本技能训练；第三篇探索篇，则是结合教师的科学研究实践编写，特别适合高年级学生开放实验设计和本科毕业论文研究。通过该教材学习，学生不仅可以掌握细胞生物学基本实验技能，同时还可以提高综合实验设计能力，激发科学研究潜能。

本书适用于高等院校生物及相关专业的师生使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学综合实验/王振英主编. — 天津: 天津科学技术出版社, 2008.12
ISBN 978-7-5308-4870-8

I. 细... II. 王... III. 细胞生物学—实验 IV. Q2-33
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 208032 号

责任编辑: 郑东红 张建锋
责任印制: 王 莹

天津科学技术出版社出版
出版人: 胡振泰
天津市西康路 35 号 邮编: 300051
电话: (022) 23332693 (编辑室) 23332393 (发行部)
网址: www.tjkjcs.com.cn
新华书店经销
天津市宝文印务有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 9.25 字数 160 000
2008 年 12 月第 1 版第 1 次印刷
定价: 20.00 元

《细胞生物学综合实验》编写人员

主编：王振英

编委(按照姓氏汉语拼音字母顺序)

董 仕 范宝莉 刘晓颖

彭永康 宇克莉 张竞秋

前 言

细胞生物学是生命科学与生物技术专业一门重要的专业基础课,主要研究细胞结构及细胞活动的基本规律。同时,细胞生物学还是一门实验性很强的学科。细胞生物学实验教学对学生生命科学知识及素质的发展具有直接和长远的影响。近年来,细胞生物学和遗传学、分子生物学等的联系日趋密切,理论发展非常迅速,然而细胞生物学实验的教学普遍滞后于理论课,存在着诸多缺陷与不足,特别是综合性、设计性实验内容少,不利于学生综合能力的培养。近年来,细胞生物学迅猛发展,理论上,分子生物学、遗传学、生物信息学、计算科学等与细胞生物学日益密切,与之相对应的细胞生物学实验技术也得到快速发展,高校细胞生物学实验课教学任务也应赋予新的内容。调整实验课程的教学计划,减少验证性、重复性实验,增加综合性、设计性实验已势在必行。综合性、设计性实验,使学生不但能够掌握基本的细胞生物学实验技术、增强对理论知识的理解,同时让学生在实验思路设计、实验结果分析、实验论文撰写等各环节得到充分锻炼,全面提高学生分析问题和解决问题的能力。

本书是一本综合性、实用性细胞生物学实验教材,全书共3篇36个实验,第一篇基础篇,主要为经典细胞生物学实验和基本方法介绍;第二篇应用篇,主要涉及基本技能训练;第三篇探索篇,则是结合教师的科学研究实践编写,特别适合高年级学生开放实验研究和本科毕业论文设计。通过该教材的学习,学生不仅可以掌握细胞生物学基本实验技能,同时还可以提高综合实验设计能力,激发科学研究潜能。

本书是本教研室一线教师通力合作共同完成的。基础部分许多实

验是教师们多年来实验教学经验的积累,如范宝莉老师编写了实验 1、2、11、12、13、14 和 15;王振英老师编写了实验 6、7、8、9 和 10;宇克莉老师编写了实验 3、4 和 5;张竞秋老师编写了实验 16 和 17。在应用篇中,结合本科毕业论文和开放实验教学实践,范宝莉老师编写了实验 18、20 和 27;彭永康老师编写了实验 19、21 和 22;王振英老师编写了实验 23、24、25 和 26。探索篇的内容则是根据教师的科学研究实践编写的,其中实验 28、32 和 33 由彭永康老师编写;实验 29、30 和 31 由董仕老师编写;实验 34 至 36 由王振英老师编写;书后的附录由刘晓颖老师完成。

本书在编写过程中得到天津市细胞生物学重点学科建设经费的大力支持,得到学校实验教学改革基金和天津市细胞遗传与分子调控重点实验室基金资助,南开大学张自立教授对本书的出版提出了很好的建设性意见,在此一并表示衷心的感谢。

由于编者的水平所限,书中难免有误,恳请广大读者批评指正。

编者

2008 年 9 月

目 录

基础篇

实验 1	光学显微镜的结构及使用	(3)
实验 2	光学显微样品的制备及细胞形态结构的观察	(8)
实验 3	电子显微镜的基本原理及构造	(11)
实验 4	透射电镜生物样品的常规制备技术	(14)
实验 5	扫描电镜常规样品制备技术	(24)
实验 6	动物细胞的原代培养	(29)
实验 7	动物细胞的传代培养	(31)
实验 8	动物细胞的冻存与复苏	(33)
实验 9	植物组织培养技术	(35)
实验 10	植物细胞的悬浮培养	(39)
实验 11	植物细胞骨架的光学显微镜观察	(41)
实验 12	细胞中脂类的染色及观察	(43)
实验 13	蛋白质的染色及观察	(45)
实验 14	多糖的染色及观察	(47)
实验 15	核酸的染色及观察	(49)
实验 16	植物分生组织细胞有丝分裂制片与观察	(51)
实验 17	植物细胞减数分裂过程染色体行为的观察	(54)

应用篇

实验 18	叶绿体的分离与观察	(59)
实验 19	植物线粒体的分离与观察	(61)
实验 20	细胞融合	(63)
实验 21	植物高频率中期细胞同步化分裂的诱导	(65)
实验 22	植物中期染色体分离与染色体形态特征观察	(68)
实验 23	植物总体 DNA 的提取	(71)
实验 24	DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析	(74)
实验 25	植物总体 RNA 的提取	(76)
实验 26	RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳分析	(79)
实验 27	蛋白质的分子量测定—SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(81)

探索篇

实验 28	除草剂甲基胺草磷对作物根尖细胞染色体畸变的效应	(87)
实验 29	鲫鱼红细胞大小的测量	(91)
实验 30	鲫鱼染色体标本制作	(93)
实验 31	鲤鱼、鲫鱼葡萄糖磷酸异构酶 (GPI) 同工酶的电泳分析	(96)
实验 32	细胞核骨架蛋白的分离与电泳	(101)
实验 33	中期染色体蛋白、染色体骨架的分离与电泳	(104)
实验 34	RAPD 分子标记技术及应用	(108)
实验 35	RAPD 标记转变为 SCAR 标记技术	(111)
实验 36	小麦基因组 AFLP 分子标记	(114)
主要参考文献		(120)
附 录		(121)

基

础

篇

实验 1 光学显微镜的结构及使用

一、实验目的

熟悉显微镜的结构和各部件基本性能；掌握低倍镜、高倍镜的正确使用方法，熟悉油镜的使用方法。

二、实验原理

成像原理：标本置于聚光器与物镜之间，目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜。平行的光线自反射镜折射入聚光器，光线经聚光器集聚增强，照射在标本上。物镜可使标本在物镜的上方形成一个倒立的放大实像（倒像），目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上，形成一个直立的实像（正像）。

三、实验材料、实验器具及药品

普通光学显微镜，擦镜纸，细胞装片，香柏油，二甲苯

四、实验方法与步骤

（一）普通光学显微镜的构造

光学显微镜由三部分组成：机械部分、光学部分和照明部分（图 1-1）

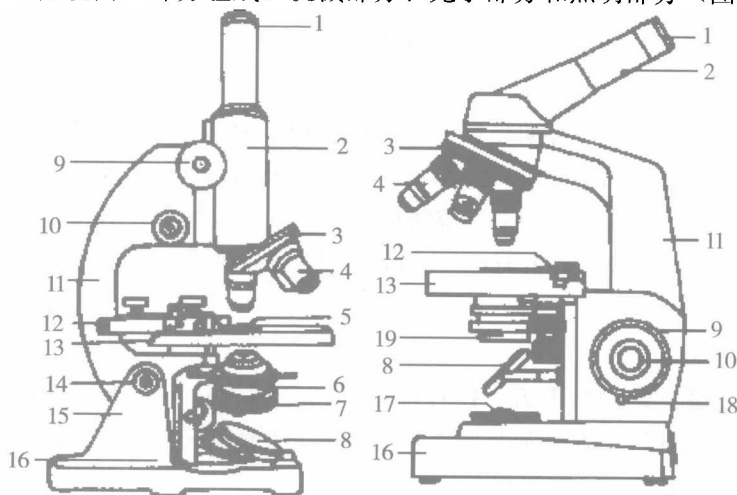


图 1-1 普通光学显微镜结构示意图（辛华，2001）

1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜 5. 通光孔 6. 聚光器 7. 光圈 8. 反光镜
9. 粗调节器 10. 细调节器 11. 镜臂 12. 移片器 13. 载物台 14. 倾斜关节
15. 镜柱 16. 镜座 17. 照明装置 18. 粗调限位环凸柄 19. 滤光片框

1. 机械部分：

(1) 镜座：显微镜的基座，起稳定和支持整个镜身的作用。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

(2) 镜柱：连接镜座和镜臂的短柱。

(3) 镜臂：镜柱上方弯曲部分，支持镜筒和镜台，拿镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有一可活动的关节叫倾斜关节，可使镜臂作适当倾斜，便于观察。但使用时倾斜度一般不应超过 45° ，以免失去重心而翻倒。镜筒倾斜式显微镜由于镜臂和镜柱连为一体，故无此关节。

(4) 镜筒：位于镜臂前方的圆筒，根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式两类，单筒式又分直立式和倾斜式两种，双筒式的镜筒均为倾斜的。镜筒上端安装目镜，下端装有旋转盘。

(5) 载物台：在镜筒下方，方形或圆形，放玻片标本用。载物台中央有一圆形通光孔，两旁各有一压片夹。有的载物台上装有标本移动器，移动器上装有弹簧夹，用于固定标本片。移动器的一侧有两个旋钮，转动旋钮可使玻片前后左右移动。

(6) 物镜转换器（旋转盘）：圆盘状，在镜筒下方，其上装有 3~4 个放大倍数不同的物镜。旋转物镜转换器可更换物镜。物镜转换器的内缘有一“T”形卡，用于对准和固定物镜位置，使物镜和光轴同心。

(7) 调节器：组装在镜臂前方或镜柱两侧的一对大小旋钮，为调节焦距之用。

大旋钮为粗调节器，转动粗调节钮可使镜筒（或载物台）升降，调节焦距。旋转一周可使镜筒（或载物台）升降 10 mm。一般用于低倍镜调焦。

小旋钮为细调节器，转动细调节钮可使镜筒（或载物台）缓慢升降，每旋转一周约使镜筒（或载物台）升降 0.1 mm。适用于高倍镜、油镜或分辨物像清晰度调焦。

2. 照明部分：

(1) 反光镜：载物台下方，镜柱前面的一个圆镜。一面为平面，一面为凹面。平面镜聚光力弱，适于强光源和平行光源。凹面镜聚光力强，适用于弱光源或散射光源。反光镜的方位可以随意调节。

(2) 聚光器：在载物台下方，由一组透镜组成，可使反射光线聚焦于标本上。一般在镜柱一侧有一旋钮，可使聚光器升降，和物镜配合使用。

(3) 光圈：在聚光器下方，由一组活动金属片组成，构成一个可开可缩的孔。在其外侧有一小柄，可以调节控制光线通过。在光圈的下方常装有滤光片

架，可以放置不同颜色的滤光片。

3. 光学部分：

(1) 目镜：短圆筒状，其上刻有放大倍数，装在镜筒上端，每台显微镜常备有 3~4 只放大倍数不同的目镜，如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等。眼睛通过目镜观察物像。

(2) 物镜：装在物镜转换器上的一组镜头，一般有低倍镜、高倍镜、油镜 3 种，每个物镜上刻有相应的标记。低倍镜筒上刻有 $10\times$ 或 $15\times$ 等标志，高倍镜筒上刻有 $40\times$ 或 $45\times$ 标志。油镜上一般为 $100\times$ 。

(二) 显微镜的使用方法

1. 低倍镜的使用：

(1) 检查：右手握镜臂，从镜箱内取出显微镜，左手托镜座，轻轻放在实验桌上。先检查一下显微镜各部件有无损坏，如发现有损坏或性能不良者，立即报告教师请求处理。

(2) 准备：将显微镜放于前方略偏左侧，将载物台下降或将镜筒升高（转动粗调节钮），使物镜与载物台距离略拉开。再旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔（可听到“咔嗒”声）。

(3) 对光：打开光圈，上升聚光器，双眼同时睁开，以左眼向目镜内观察，同时调节反光镜的方向，直到视野内光线明亮均匀为止。反光镜的平面镜易把其他景物映入视野，一般用凹面镜对光。

(4) 放置玻片标本：将玻片标本放在载物台上，用弹簧夹夹住标本，把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(5) 调节焦距：从显微镜侧面注视物镜镜头，同时旋转粗调节器，使镜筒缓慢下降（或镜台上升），低倍镜头与玻片间的距离约 5 mm 时，再用左眼从目镜里观察视野，左手慢慢转动粗调节器，使镜筒缓缓上升，直至视野中出现物像为止，再转动细调节器，使物像更加清晰。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时，原因可能如下：

(1) 转动粗调节器太快，超过焦点。应按上述步骤重新调节焦距。

(2) 标本未放在视野内，应移动玻片标本寻找观察对象。

(3) 物镜没有对正，应对正后再观察。

(4) 光线太强，尤其观察比较透明的标本或没有染色的标本时，易出现这种现象，应将光线调暗一些后，再观察。

2. 高倍镜的使用：

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜，用手移动转换器，换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微上下转动细调节器，直至看到清晰的物像为止。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时，原因可能如下：

(1) 观察的部分不在视野内，应在低倍镜下寻找到后，移到视野中央，再换高倍镜观察。

(2) 标本片放反了，应把标本片放正后，再按上述步骤操作。

(3) 焦距没调好，应仔细调节焦距。

如需要更换标本时，应该先把镜筒升高（或载物台下降），然后把标本移到载物台前方，再取下。

3. 油镜的使用方法：

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像，把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开，在标本片上滴一滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，可调节细调节器，即可看清物像。如仍不清楚，重复上述步骤。

(3) 找到物像后，再调节聚光器和光圈，选择最适光线。

(4) 油镜使用完毕后，上升镜头约 10 mm，把镜头转到一边，用擦镜纸蘸少许二甲苯轻擦然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖片的标本片，可用擦镜纸蘸少许二甲苯，把油擦净。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油。方法是：先把一小张擦镜纸盖在油滴上，再滴上二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净。也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

（三）使用显微镜的注意事项

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂，左手托镜座，切勿一手斜提，前后摆动，以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时，显微镜离实验台边缘应保持一定距离（5 cm），以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过 45°，用完立即还原。

(3) 观察带有液体的临时标本时要加盖片，不能使用倾斜关节，以免液体污染镜头和显微镜。

(4) 禁止随意拧开或调换镜头、聚光器等零件。

(5) 使用时要严格按步骤操作，熟悉显微镜各部件性能，掌握粗、细调节器的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节器向下时，眼睛必须注视物镜头。

(6) 粗、细调节器要配合使用，细调节器不能单方向过度旋转，调节焦距时，要从侧面注视镜筒下降，以免压坏标本和镜头。

(7) 用单筒显微镜观察标本，应双眼同时睁开，左眼观察物像，右眼用以绘图，左手调节焦距，右手移动标本或绘图。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布或其他粗糙东西擦拭，以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂如碘、酸类、碱类、乙醇溶液等都不可与显微镜接触，如不慎污染时，应立即擦净。

(10) 实验完毕，要将玻片取出，用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开，不能与通光孔相对。用绸布包好，放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下暴晒。

五、实验结果分析及注意事项

注意区分低倍镜、高倍镜和油镜，根据需要选择显微镜。

六、思考题

1. 显微镜使用过程中有哪些注意事项？
2. 为什么使用高倍镜时，必须从低倍镜开始？

实验 2 光学显微样品的制备及细胞形态结构的观察

一、实验目的

了解动物、植物细胞的基本形态结构；掌握临时装片方法；进一步掌握光学显微镜的使用方法。

二、实验原理

细胞是生物体的基本结构和功能单位，它们的形态多样，有圆形、方形、梭形和星状等。一般而言，真核细胞的体积要大于原核细胞，高等动物的卵细胞大于体细胞，对于大多数高等动物的细胞来说，其体积一般在 $20\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ 之间，大多需借助于光学显微镜才能被观察到。

三、实验材料、实验器具及药品

1. 实验材料：活体青蛙、人口腔上皮细胞、洋葱。
2. 实验器具：显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、牙签、纱布、棉花、吸水纸、剪刀、玻璃缸、碘液、吉姆萨（Giemsa）染液、甲醇。
3. 药品及配制：

Giemsa 染液：称取 Giemsa 粉剂 1 g，倒入研钵内，从量好的 66 mL 甘油中取出少量加入研钵中，充分研磨至无 Giemsa 颗粒为止，再将剩下的甘油全部倒入并充分混匀，然后倒入 200 mL 烧杯中，放入 $55^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 的水浴箱中加热 2 h 并不断搅拌，待冷却后加入甲醇 66 mL，混合均匀后即成 Giemsa 原液，密封保存于棕色瓶中。使用时，取原液 1 份，加 9 份 $1/15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液（pH6.8）混合均匀即成 Giemsa 工作液。现配现用。

四、实验方法与步骤

（一）人口腔黏膜上皮细胞标本的制备与观察

1. 载玻片的清洁：制备玻片标本所用的载玻片和盖玻片要求非常清静，其清洁步骤如下：载玻片先用洗衣粉刷洗，清水冲洗后，经洗液浸泡 24 h 以上，再用流水充分冲洗，最后烤干备用。对于临时制片所用的载玻片和盖玻片若要求不高也可用揩擦的办法来清洁，即取一张载玻片，用左手拇指和示指夹持载玻片

的两端，右手的拇指和示指夹着一块清洁而柔软的布，把载玻片放在两手指夹着的布间，然后均匀地前后移动，擦净载玻片的两面。盖玻片小而薄，擦时必须特别小心，把一张盖玻片平放在左手两手指夹着的布间，并轻轻捏住，右手指夹持盖玻片的边缘向一个方向转动进行擦拭，用力需轻而均匀。

2. 口腔黏膜细胞涂片标本的制备：吸取一滴碘液在一张洁净的载玻片中央，用一根事先消过毒的牙签，伸入自己的口腔内壁轻轻刮取黏膜上皮细胞，然后将它涂在载玻片上的染液中并来回搅动使细胞散开，染色 10~20 min 后加盖玻片。若盖玻片周围水分过多，可用吸水纸吸去边缘多余的水分。

3. 观察：将自制的口腔黏膜上皮细胞标本置于低倍镜下观察，寻找较分散的、轮廓清晰的单个细胞，移至视野中央，转到高倍镜观察。

高倍镜下可见人的口腔黏膜细胞外围有一层薄薄的细胞膜，扁圆形的细胞核呈鲜红色（如用碘液染则为深黄色），位于细胞中央，细胞质染成浅红色或浅黄色。

（二）洋葱鳞茎表皮细胞的观察

1. 洋葱鳞茎表皮细胞装片标本的制备：取一擦净的载玻片，滴一滴碘液，将洋葱鳞茎用小刀分为几块，取一块肉质鳞叶（靠近鳞茎中心的鳞叶），用镊子在其内表面（凹面）轻轻撕下一小块膜质表皮，剪成约 3~4 mm² 的小块，置于载玻片的碘液滴中，铺平，盖上盖玻片。

2. 观察：将制备好的装片标本放在显微镜下，先用低倍镜观察，可见许多长柱状排列整齐、彼此相连的细胞，选择其中一个较典型的细胞移至视野中央，再转换高倍镜。仔细观察以下结构：

（1）细胞壁（cell wall）：为细胞最外面的一层由纤维素组成的较厚结构（它是植物细胞的重要特征之一）。细胞质膜（plasma membrane）位于细胞内壁并与其紧密相贴，光镜下不易分辨。

（2）细胞核（nucleus）：位于细胞中央，呈椭圆形。成熟的细胞由于液泡挤压，核位于质膜边缘。调节显微镜细调节螺旋，可见核内有 1~2 个折光较强的核仁。

（3）细胞质（cytoplasm）：细胞膜与细胞核之间的区域，其中可见一至数个充满液体的小泡，称为液泡（vacuole）。

（三）蛙血涂片标本的制作与观察

取活青蛙或蟾蜍一只，用剪刀剪断后肢，或心脏取血。用剪刀剪开蟾蜍或蛙的胸腔，暴露心脏，剪开心包膜，弄破心脏，迅速用吸管吸取心脏流出的血液，滴一滴在载玻片右端，注意每滴血的血量不宜过多。另取一张边缘光滑的载玻