

YIXUE XIBAO YU YICHUANXUE SHIYAN JIAOCHENG

医学细胞与 遗传学实验教程

主编 刘 雯



复旦大学出版社

www.fudanpress.com.cn

本书由复旦大学出版基金资助出版

医学细胞与 遗传学实验教程

主 编 刘 雯

主 审 左 伋

副主编 卜晓波 王晓玲 李 兰 张春斌

金 洁 高志芹 谢 菁

编写人员 (以姓氏笔画为序)

卜晓波 于文静 王晓玲 李 兰 刘晓宇

刘 雯 杜长青 杨 玲 张春斌 张淑红

宋 洁 岳凤珍 金 洁 夏蓓莉 高志芹

韩彦龙 谢 菁 潘智芳

YIXUE XIBAO YU YICHUANXUE SHIYAN JIAOCHENG



NLIC2970376414



复旦大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞与遗传学实验教程/刘雯主编. —上海:复旦大学出版社, 2008. 10
ISBN 978-7-309-06315-8

I. 医… II. 刘… III. ①人体细胞学-实验-教材②医学遗传学-实验-教材 IV. R329.2-33 R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 154100 号

医学细胞与遗传学实验教程

刘 雯 主编

出版发行 复旦大学出版社 上海市国权路 579 号 邮编 200433
86-21-65642857(门市零售)
86-21-65100562(团体订购) 86-21-65109143(外埠邮购)
fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com

责任编辑 傅淑娟

出品人 贺圣遂

印 刷 上海申松立信印刷厂
开 本 787 × 960 1/16
印 张 10.5
字 数 177 千
版 次 2008 年 10 月第一版第一次印刷

书 号 ISBN 978-7-309-06315-8/R · 1051

定 价 21.00 元

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

内 容 提 要

本教材是针对医学院校“细胞与遗传实验”课程而编写。内容涉及面广，从细胞到个体、人群；从正常的细胞结构、遗传物质到细胞损伤的观察与研究、遗传疾病分析兼顾基础和临床两个方面，涉及细胞与遗传的多种实验技术、方法，并设计了综合性的实验，以开拓学生的实验思路和创新能力。本教材也可作为传统实验课程的指导用书。

前 言

医学是一门实验性或实践性科学。在传统的医学教育体系中,实验或实践往往是依附于理论课程的。其优点是理论联系实际,符合医学学科的性质;缺点是实验或实践是配合理论,并不自成体系,不能使学生养成通过实验或实践来发现问题、提出问题,进而解决问题的习惯和思维。因此,把实验或实践作为一门独立的课程有一定的意义。在国家提出创新教育的政策下,全国有许多医学院校把实验作为独立的课程开设,如人体机能学实验等。

本教材是针对部分医学院校独立开设的“细胞与遗传学实验”课程编写的。教材内容涉及面广,从细胞到个体、人群,从正常的细胞结构、遗传物质到细胞损伤的观察与研究、遗传疾病分析,兼顾基础和临床两个方面,涉及细胞与遗传的多种实验技术、方法,并设计了综合性的实验,以开拓学生的实验思路和创新能力。当然,本教材也可作为传统实验课程的指导用书。

本教程在编写过程中得到了兄弟院校的大力支持,在此表示衷心的感谢。由于编者水平有限,在实验内容的选取、方法的描述上都可能有不当之处,敬请读者提出宝贵意见。

刘 雯

2008 年 8 月

目 录

第一篇 组成人体的细胞

第一章 细胞形态的观察	(3)
第一节 光学显微镜技术	(3)
第二节 电子显微镜技术	(5)
第二章 基于抗体的细胞化学显示	(8)
第一节 抗体的标记	(8)
第二节 免疫组织(细胞)染色技术	(9)
第三节 免疫沉淀与免疫共沉淀	(18)
第四节 免疫印迹	(21)
第五节 抗体芯片	(24)
第三章 亚细胞结构的分离与鉴定	(26)
第一节 亚细胞结构分离的技术	(26)
第二节 细胞核与线粒体的分级分离	(27)
第三节 微粒体的分离	(29)
第四节 溶酶体的分离	(29)
第五节 细胞总蛋白质的分离提取	(30)
第四章 细胞培养	(33)
第一节 细胞培养概述	(33)
第二节 培养细胞的生物学特性	(36)
第三节 原代培养与传代培养	(40)
第四节 细胞系或细胞株的建立、鉴定、管理	(43)

第五节	培养细胞的生物学特性分析	(45)
第六节	细胞的冻存与复苏	(52)
第七节	细胞培养的基本操作规程与细则	(53)
第五章	细胞的功能	(59)
第一节	巨噬细胞的吞噬功能	(59)
第二节	细胞膜的通透性	(60)
第三节	细胞的迁移	(62)
第四节	Transwell 实验	(63)
 第二篇 细胞的遗传物质 		
第六章	细胞内核酸的提取	(69)
第一节	真核细胞基因组 DNA 的分离与纯化	(69)
第二节	真核细胞总 RNA 的分离提取	(71)
第三节	质粒 DNA 的碱裂解法提取与纯化	(73)
第四节	线粒体 DNA 的提取	(74)
第七章	核酸杂交技术	(76)
第一节	核酸探针	(77)
第二节	Southern 杂交技术	(79)
第三节	Northern 杂交技术	(86)
第四节	斑点杂交狭缝杂交技术	(91)
第八章	基因表达的分析技术	(93)
第一节	PCR 技术	(93)
第二节	单链构象多态性(SSCP)分析	(97)
第三节	基因表达谱研究技术	(100)
第九章	染色体分析相关的实验	(109)
第一节	人类染色体标本的制备	(109)

第二节 染色体 G 显带技术	(112)
第三节 姐妹染色单体技术	(114)
第四节 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检测	(117)
第五节 荧光原位杂交	(120)

第三篇 遗传的家系和群体分析

第十章 遗传病的家系分析	(129)
第一节 系谱分析	(129)
第二节 Bayes 法在遗传咨询中的应用	(131)
第十一章 群体遗传分析相关的实验	(135)
第一节 群体平衡定律的应用	(135)
第二节 人类性状的遗传学分析	(138)
第三节 人类的皮肤纹理分析	(140)
第四节 遗传度、杂合度、多态信息量和吻合度测验	(143)

第四篇 细胞与医学遗传综合实验

第十二章 细胞生物学综合实验	(149)
第十三章 遗传病的诊断、分析与咨询实验	(151)

第一篇

组成人体的细胞

第一章 细胞形态的观察

显微镜扩大了生物研究的视野。自从 18 世纪人们通过显微镜观察到细胞之后,生物学家利用各种各样的显微镜研究细胞的形态及其功能。回顾细胞生物学的发展历程,我们可以看出显微镜的不断改良促进了细胞生物学的发展,而细胞生物学的发展对显微镜的性能又不断提出更高的要求。

第一节 光学显微镜技术

在细胞学研究中,光学显微镜(light microscopy,简称光镜)技术发挥了重要作用。目前人们将多种现代生物学技术、计算机技术融入光镜技术,使光镜能显示出更细微、更清晰的细胞结构。

一、普通光镜技术

光镜一般由光学部分、机械部分和照明部分组成,其中光学部分最为关键,它由目镜(eyepiece)、物镜(objective lens)组成。普通光镜的最大分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$ 。由于动物细胞一般是无色与半透明的,所以样品在观察前要经过染色。不同的染料对某种细胞组分有特异的吸附,这样便能形成足够的反差以区分该种细胞组分。如最常用的染色液苏木精对带负电荷的分子有较强亲和力,因此可揭示出 DNA、RNA 和酸性蛋白质在细胞中的分布;而伊红和亚甲蓝(美蓝)能特异性地与不同蛋白质结合,从而显示出这些蛋白质在细胞内的分布情况。

二、相差和微分干涉显微镜技术

1932 年,德国物理学家 Fritz Zernicke 研究发现光线在通过生物标本时,除了波长和振幅的变化外,还有相位的差异,只有将这种相位差转变成振幅差时,才能被人眼分辨出来,即相差理论。将这一理论应用于显微镜,从而发明了相差显微镜(phase contrast microscope)。在实验中,常用的是倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope),它的光源和聚光镜装在载物台上方,相差物镜在载物台下方,这样更便于观察培养瓶中的活细胞。

三、荧光显微镜技术

荧光显微镜(fluorescence microscope)是以紫外线为光源来激发生物标本中的荧光物质,产生能观察到各种颜色荧光的一种光学显微镜,它是研究特异蛋白质等生物大分子定性定位的最有力的工具之一(图 1-1)。

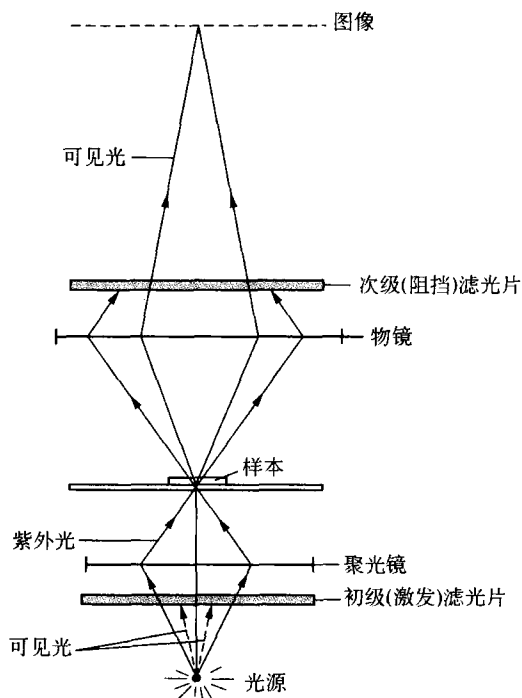


图 1-1 荧光显微镜原理

将细胞本身存在的物质经紫外线照射后发出的荧光称自发荧光。另一些细胞内成分经紫外线照射后不发荧光,但若用荧光染料进行染色后,就能在荧光显微镜下观察到荧光,这种荧光称为诱发荧光。目前可供选择的荧光染料很多,如(DAPI)联脒基苯吡啶可以染 DNA,吖啶橙(acridine orange)可以使 DNA、RAN 上色,碘化丙啶(propidium iodide)可以使 DNA 着色, Hoechst33258、Hoechst33342 可以将染色体着色。将荧光染料和抗体共价结合,被标记的抗体和相应的抗原结合形成抗原抗体复合物,经激光激发后发射荧光,从而可以观察了解抗原在细胞内的分布。

四、激光共焦点扫描显微镜技术

激光共焦点扫描显微镜(laser scanning confocal microscope)是 20 世纪

80 年代出现的一种新型的显微镜,它是在荧光显微镜成像的基础上装有激光扫描装置,以单色激光作为光源,使样品被激发出荧光,利用计算机进行图像处理,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像(图 1-2)。这样形成的图像异常清晰,其分辨率比普通荧光显微镜提高 1.4~1.7 倍。图 1-2A 显示激光束(光源)经双色镜反射后,通过物镜汇聚到样品某一焦点;B 则表示从焦点发射的荧光(样品一般经免疫荧光标记)经透镜汇聚成像再被检出;C 表示通过样品其他部位的激光即激光发出的荧光不会聚焦成像,因而检测器不能检出所谓共焦点是指物镜和聚光镜同时聚焦到同一个小点,即它们互相共焦点。

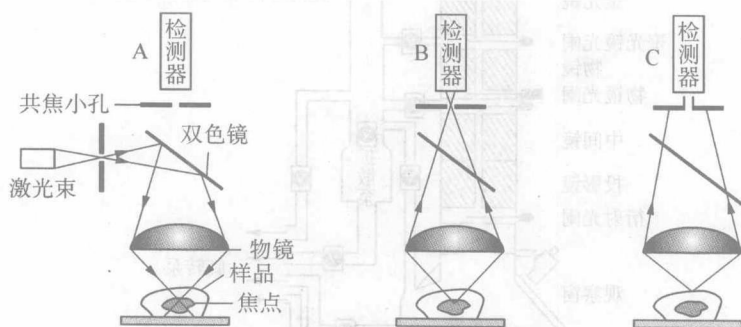


图 1-2 激光共焦点扫描显微镜的原理

第二节 电子显微镜技术

一、透射电子显微镜技术

(一) 基本原理与结构

把小于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的细微结构称为亚显微结构(submicroscopic structures)或超微结构(ultramicroscopic structures; ultrastructures)。1932 年 Ruska 发明了以电子束为光源的透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),电子束的波长要比可见光和紫外光短得多,并且电子束的波长与发射电子束的电压平方根成反比,也就是说,电压越高波长越短,目前 TEM 的分辨力可达 $0.2\ \text{nm}$,放大倍数最高可达近百万倍。

电子显微镜(简称电镜)主要由四部分组成(图 1-3):①电子束照明系统:包括电子枪、聚光镜。由高频电流加热钨丝发出电子,经高压使电子加速,经过聚光镜汇聚成电子束。②成像系统:包括物镜、中间镜与投影镜等。它们是若干精密加工的中空圆柱体,里面装置线圈,通过改变线圈的电流大

小,调节圆柱体空间的磁场强度。电子束经过磁场时发生螺旋式运动,最终的结果如同光线通过玻璃透镜时一样,聚焦成像。③真空系统:用两级真空泵不断抽气,保持电子枪、镜筒及记录系统内的高真空。④记录系统:电子成像须通过荧光屏显示用于观察,或用感光胶片记录下来。

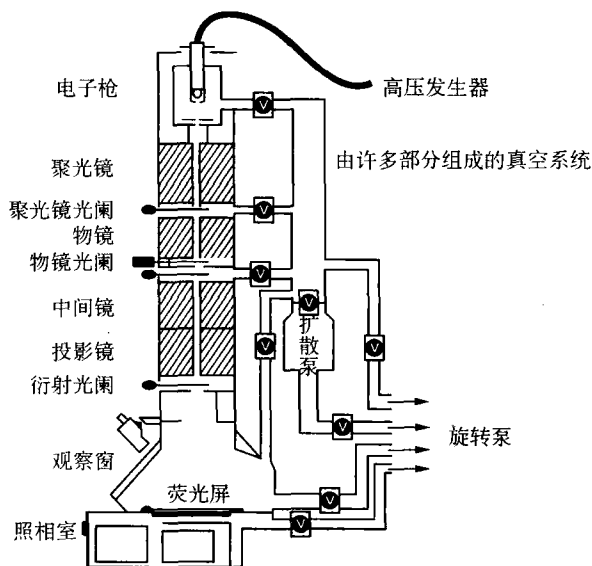


图 1-3 透射电子显微镜的结构组成示意图

另外,由于电子在空气里穿透力很弱,所以电镜的镜筒必须抽成真空,否则高速运动的电子核气体分子相互碰撞,会使高速电子散射而偏离轨道,使电镜不能正常工作。电镜镜筒的真空度越高,其使用性能也就越好。

(二) 电镜制样技术

1. 超薄切片的制备:由于电子束的穿透能力有限,为了获得较高分辨率,需要使用超薄切片机制成厚度一般仅为 40~50 nm 的超薄切片。

(1) 固定是电镜样品制备过程中最重要的一个环节,若固定方法选得适当,样品的超微结构尽能十分接近活体状态。目前常用的固定剂为四氧化锇(OsO_4)和戊二醛等。

(2) 包埋的目的是要使样品中各种细微结构在切片中得到均匀良好的支撑,使切成的超薄切片仍能保持连续完整并且有足够的强度,并可耐受干燥以及电子轰击、高温和真空挥发。

(3) 包埋好的组织需用超薄切片机切成超薄切片,其厚度一般是 40~50 nm,以热膨胀或螺旋推进的方式推进样品切片。

(4) 由于生物样品多是由 C、H、O、N 等元素组成, 这些元素原子序数低, 散射电子能力弱, 在电镜下的反差很弱, 因此通常需用高分子量的金属盐对超薄切片进行染色, 以形成明暗反差。常用的染色液是醋酸双氧铀(易染核酸)和铅盐(易染蛋白质)。

2. 负染色技术: 一些细小的颗粒标本如线粒体基粒、核糖体、纤维蛋白、病毒等可以通过负染色(negative staining)电镜技术观察其精细结构, 其分辨率可达 1.5 nm 左右。最常用的染色剂是 2% 磷钨酸水溶液。

3. 冷冻蚀刻技术: 冷冻蚀刻(freeze etching)的基本操作过程是将样品用液氮固定后, 然后装入专门的冷冻蚀刻仪中, 在低温真空状态下进行断裂。这时样品往往从其结构相对“脆弱”的部位(如膜脂双分子层的疏水端)断裂。然后稍稍升温, 使断裂面上的冰少量升华, 这样埋在冰中的蛋白质颗粒的立体结构就会进一步增强, 这一过程称为蚀刻。随后从 45° 方向用铂、金等金属进行喷镀, 这样整个断裂面的微细结构就复印在这层金属薄膜上(又称复型膜), 再从垂直方向喷一层碳, 加固复型膜, 最后用消化液把样品本身消化掉, 将剩下的复型膜捞在载网上, 干燥后用投射电镜直接进行观察。

二、扫描电镜技术

20 世纪 60 年代, 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)逐渐引起人们的重视, 其电子枪发射出的电子束被电磁透镜汇聚成极细的电子“探针”, 在样品表面进行“扫描”, 电子束可激发样品表面放出二次电子, 二次电子产生的多少与样品的形状有关。二次电子由探测器收集, 并被转化成光信号, 再经光电倍增管和放大器转变成电压信号来控制荧光屏上电子束的强度。这样, 样品不同部位上产生二次电子多或少的差异, 直接反映在荧光屏相应部位亮或暗的差别, 从而得到一幅放大的立体感很强的图像(图 1-4)。

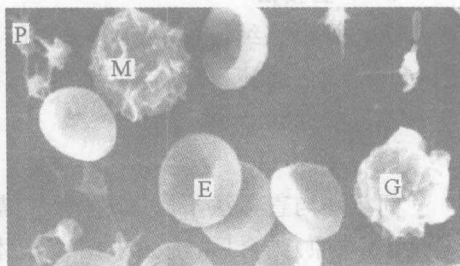


图 1-4 扫描电镜下的血细胞

(石河子大学 谢 菁)

第二章 基于抗体的细胞化学显示

在生命科学研究领域,抗体已被成功地应用于捕获靶分子(抗原)、亲和层析纯化蛋白质、组织细胞中靶分子定位研究等诸多方面。这些技术所利用的其实就是抗体与抗原发生特异性结合的特性,所有这些基于抗体的研究技术主要分为4种类型:①利用抗体“示踪”靶分子;②利用抗体去捕获靶分子;③利用抗体进行蛋白质功能学研究;④通过和芯片技术的结合用于蛋白质表达谱研究。

第一节 抗体的标记

在绝大多数情况下,当抗体分子被应用于研究时均需要被标记。依据实验目的不同,所采用的标记方法和标记物通常也是不同的。

一、抗体标记的直接法与间接法

(一) 直接法

直接法是将纯化后的抗体先与已标记物直接结合,然后再与靶分子(抗原)结合,通过检测抗体所携带的标记物来对靶分子(抗原)进行定性、定位、定量测量的方法。

(二) 间接法

间接法与直接法不同,抗体既不需纯化也不需标记,而是在抗体与相应靶分子(抗原)结合后,洗去未结合抗体,然后通过利用已标记好的第二抗体(二抗)与一抗的结合来间接标记出靶分子(抗原)的存在情况。此方法带有比直接法更多的标记物,因此较直接法灵敏。

二、标记物的选择

无论是直接法还是间接法,标记物的选择至关重要。表2-1所列出的就是一些常用标记物及其相应的检测方法和优缺点等。

表 2-1 标记物的选择

标记物	检测方法	优 点	缺 点	应 用
生物素	与各种标记物偶联的亲生素与链霉亲和素	保存时间长,灵敏度高,检测手段多样	步骤过多,存在内源性生物素干扰,有些底物对人体有害	免疫组化、免疫印迹
荧光色素	荧光显微镜或荧光计	保存时间长,分辨率高	自发荧光,易淬灭	免疫组化
酶	底物显色	保存时间长,灵敏度高,肉眼直接可见,检测手段多样	步骤过多,存在内源性酶的干扰,分辨率低,有些底物对人体有害	免疫组化、免疫印迹
^{125}I 或 ^{131}I	γ 计数仪、放射自显影	易于直接标记,灵敏度高	半衰期短,对人体有害	免疫印迹、定性定量免疫分析
生物合成	放射自显影、 β 计数仪	不损伤抗体、操作简便	半衰期短,敏感性低,需杂交瘤细胞	免疫印迹、定性定量免疫分析
胶体金	光镜、电镜、肉眼	特异性强、灵敏度高、应用范围广、可用于双重和多重标记	对试剂、玻璃器皿的要求极高,标记物浓度较高	免疫组化、流式细胞术、定性定量免疫分析

第二节 免疫组织(细胞)染色技术

一、基本概念

免疫组织化学技术 (immunohistochemistry) 或免疫细胞化学技术 (immunocytochemistry) 是用经标记的特异性抗体在组织细胞原位通过特异性抗原抗体反应和化学的呈色反应, 对相应抗原进行定性、定位、定量测定的一项技术。它将抗原抗体免疫反应的特异性、组织化学的可见性结合起来, 借助显微镜(包括荧光显微镜、电镜)的显像与放大作用, 在细胞、亚细胞水平检测各种细胞组织成分, 如蛋白质、多肽、核酸、部分类脂、多糖、激素、病原体(寄生虫、细菌病毒)、受体、神经介质、肿瘤的标记物(抗原或相关抗原)等。它是免疫学、病理生理学和蛋白质研究的重要技术手段。