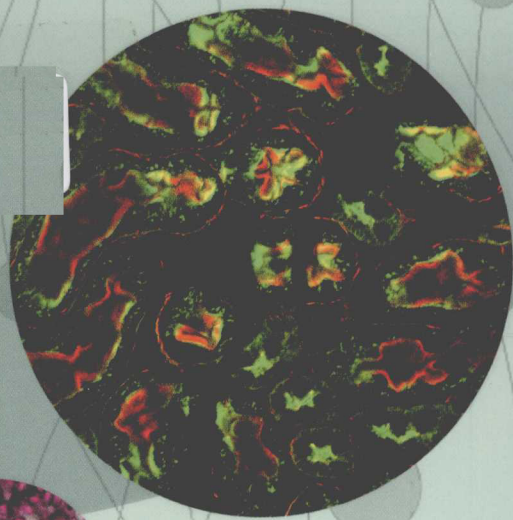
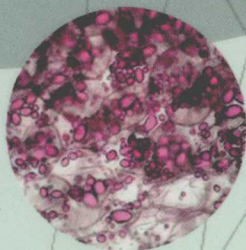
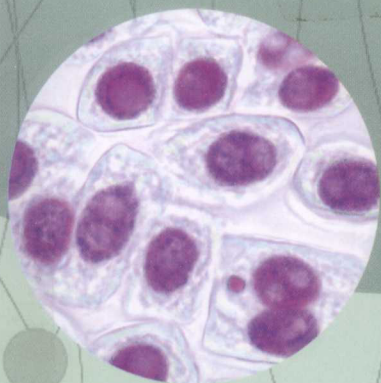


21世纪高等院校教材

# 细胞生物学 实验教程

马丹炜 王万军 主编



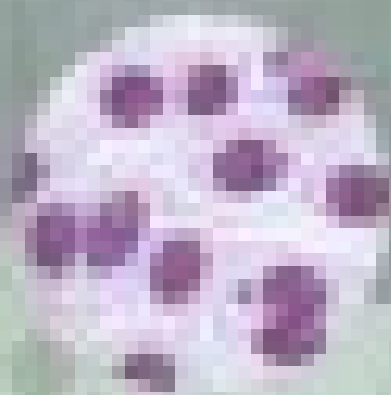
科学出版社  
www.sciencepress.com

21世纪课程教材

# 细胞生物学

## 实验教程

主编 王喜忠 副主编 王明



高等教育出版社  
www.heupress.com.cn

21 世纪高等院校教材

# 细胞生物学实验教程

马丹炜 王万军 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本教材从基础性实验、综合性实验和设计性实验 3 个层面设置了 24 个实验项目,旨在培养学生的基本实验技能和综合创新能力,内容涵盖光学显微镜技术、细胞化学技术、细胞器的分离和鉴定技术、染色体标本制作技术、细胞培养和细胞融合技术、染色体畸变检测技术、细胞凋亡检测技术以及细胞生物学设计性实验的选题、设计和实施等内容,附录部分附有常用试剂的配制、光学显微镜和电子显微镜的构造和使用方法、器械清洗方法、常用参数换算以及实验报告的写作方法,以备查阅。

本教材可作为高等院校生命科学、生物技术专业以及农学、林学、医学等相关专业细胞生物学的实验指导用书,也可作为相关学科科研人员的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程/马丹炜,王万军主编. —北京:科学出版社,2010.6  
(21 世纪高等院校教材)  
ISBN 978-7-03-028058-9

I. ①细… II. ①马…②王… III. ①细胞生物学-实验-高等学校-教材  
IV. ①Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 115823 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2010 年 6 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2010 年 6 月第一次印刷 印张:12 1/4

印数:1—3 500 字数:240 000

定价:23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 《细胞生物学实验教程》编写成员

主 编:马丹炜 王万军

副主编:王亚男 杨 军 张年辉 罗 通 马义才

编 委:(按姓氏汉语拼音排序)

曹慕岚(攀枝花学院)

陈丽萍(四川师范大学)

陈卫英(西华师范大学)

陈祥贵(西华大学)

冯 鸿(四川教育学院)

罗 群(四川教育学院)

罗 通(宜宾学院)

李玉锋(西华大学)

马丹炜(四川师范大学)

马义才(电子科技大学)

伍春莲(西华师范大学)

王万军(西南交通大学)

王亚男(四川师范大学)

王 煜(四川师范大学)

叶 春(西南交通大学)

杨 军(西华师范大学)

杨 孔(西南民族大学)

闫秋洁(绵阳师范学院)

叶 昕(乐山师范学院)

张 红(四川师范大学)

张年辉(四川大学)

## 前 言

细胞生物学(cell biology)是从不同层次(显微水平、亚显微水平和分子水平)研究细胞基本生命活动规律的科学。从1665年英国学者 Robert Hooke 第一次用自制的显微镜观察软木薄片描述细胞构造开始,细胞生物学每一个重大发现或重大突破的获得都是以新技术、新方法的引入作为前提的,因此细胞生物学是一门实验学科,实验教学在细胞生物学的整个教学环节中起着举足轻重的作用。

为了适应高校人才培养模式的变化,我们组织多所大学教学一线的骨干教师,在多年实验教学和教学改革的基础上,编写了本教材,希望本教材的出版能够在提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力方面发挥作用。本教材将实验分为基础性实验、综合性实验和设计性实验3种类型。基础性实验是经过精选的、最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础;综合性实验由多种实验技术和多层次的实验内容所组成,主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力,为设计性实验的顺利开展做好准备;设计性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,以相应学科的研究为主,结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。

附录部分附有常用试剂的配制、光学显微镜和电子显微镜的构造和使用方法、器械清洗方法、常用参数换算以及实验报告的写作方法,以备查阅。在本教材的使用过程中,各学校可根据自身实验条件和教学目标灵活选取实验内容。

参加本教材编写工作的单位包括四川师范大学、西南交通大学、四川大学、电子科技大学、西华师范大学、西华大学、宜宾学院、四川教育学院、西南民族大学、绵阳师范学院和乐山师范学院。本教材的出版得到了四川师范大学教务处专项经费的资助和各参编单位的大力支持,在此一并表示最诚挚的谢意!

由于编者水平有限,教材中难免存在着不足和缺陷,希望使用本教材的教师、学生和相关科学工作者提出宝贵意见,以便我们及时修正。

马丹炜

2010年春

# 目 录

## 前言

## 第一部分 基础性实验

实验 1 细胞的形态观察和大小测定 .....	3
实验 2 暗视野显微镜的使用 .....	7
实验 3 相差显微镜的使用 .....	10
实验 4 荧光显微镜的使用 .....	14
实验 5 细胞器的活体染色 .....	21
实验 6 细胞内核酸的原位显示 .....	24
实验 7 细胞内蛋白质的定位 .....	27
实验 8 细胞内酶的定位 .....	29
实验 9 细胞内糖类的显示 .....	34
实验 10 细胞内脂类的显示 .....	36
实验 11 骨髓细胞染色体标本的制备 .....	38
实验 12 酶联免疫吸附测定法 .....	41

## 第二部分 综合性实验

实验 13 细胞器的分离和鉴定 .....	49
实验 14 完整叶绿体和叶绿体亚组分的分离及其鉴定 .....	54
实验 15 细胞膜的通透性和巨噬细胞的吞噬活动 .....	57
实验 16 细胞骨架的显示和光学显微镜观察 .....	61
实验 17 动物细胞培养 .....	67
实验 18 细胞同步化 .....	76
实验 19 动物细胞融合 .....	80
实验 20 植物原生质体的分离、融合和培养 .....	84

## 第三部分 设计性实验

实验 21 逆境对植物细胞膜系统的损伤和破坏 .....	91
实验 22 植物细胞悬浮培养 .....	94
实验 23 微核的诱导和检测 .....	97

---

---

实验 24 细胞凋亡的诱导和检测 .....	101
------------------------	-----

附 录

附录 I 常用染料简介和常用染色剂配方 .....	111
附录 II 细胞生物学实验常用缓冲液的配制 .....	121
附录 III 细胞生物学实验常用培养基的配制 .....	128
附录 IV 常用生物固定液 .....	135
附录 V 封片剂和粘贴剂 .....	141
附录 VI 光学显微镜技术 .....	143
附录 VII 电子显微镜技术 .....	156
附录 VIII 器械的清洗与消毒 .....	166
附录 IX 撰写细胞生物学实验报告的要求 .....	170
附录 X 实验室常用技术参数 .....	179
参考文献 .....	184



# 第一部分 基础性实验



## 实验 1 细胞的形态观察和大小测定

细胞是生命活动的基本结构单位和功能单位。多细胞生物体内有不同类型的细胞，其形态、大小差异较大，典型的人和动物细胞直径为  $10\sim 20\mu\text{m}$ ，一般植物细胞的大小为几十微米，很难用肉眼观察，因此，需借助显微镜才能观察到细胞内部结构。一般光学显微镜最大分辨率为  $0.2\mu\text{m}$ ，细胞内的一些结构，如线粒体、质体、高尔基体、中心体、核仁、染色体等都大于  $0.2\mu\text{m}$ ，能在光镜下观察到，通常把在光镜下所见到的结构称为显微结构（microscopic structure）。

细胞大小测量是研究细胞的基本方法之一。在显微镜下测量细胞大小的工具是显微测微尺。显微测微尺由物镜测微尺（stage micrometer，简称物微尺或台微尺）和目镜测微尺（ocular micrometer，简称目微尺）组成（图 1.1），二者要配合使用。目镜测微尺是一个可以放在目镜内的一直径为  $2\text{cm}$  的特制圆形玻片，其上有 50 或 100 等分格的刻度尺。每一小格表示的长度随着不同显微镜、不同放大倍数的物镜而异；物镜测微尺为一特制载玻片，中央贴一圆形盖玻片，封固着一个具有精细刻度的标尺，标尺长度为  $1\text{mm}$ ，等分为 100 格，每格长  $0.01\text{mm}$  ( $10\mu\text{m}$ )，标尺的外围有一小黑圈。因为目微尺测量的是细胞经过物镜放大后的像，因而它每格所代表的实际长度随着物镜的放大倍率而变化。因此当测量细胞大小时，需要先用物微尺标定目微尺每一格所代表的实际长度，然后移去物微尺，换上待测标本，再测定细胞大小，而不能用目镜测微尺直接测量细胞。

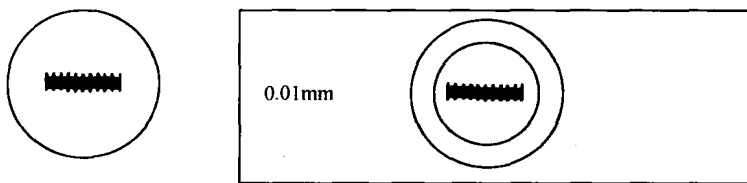


图 1.1 目微尺（左）和物微尺（右）的外观形态（辛华，2004）

### 【实验目的】

- (1) 认识光学显微镜下细胞的各种形态结构。
- (2) 掌握测微尺的基本原理、安装和使用方法。

## 【材料、器材和试剂】

材料：人体口腔黏膜上皮细胞（epithelial cell）、洋葱（*Allium cepa* Linn.）鳞茎。

器材：显微镜、显微测微尺（物镜测微尺和目镜测微尺）、擦镜纸、刀片、载玻片、盖玻片、牙签、吸水纸。

试剂：无水乙醇、香柏油、1%碘液、1%甲苯胺蓝。

## 【实验方法和步骤】

### 1. 细胞形态的观察

#### 1) 口腔黏膜上皮细胞的观察

口腔黏膜细胞涂片标本的制备：吸取一滴碘液或甲苯胺蓝溶液滴在一张洁净的载玻片中央，用一根事先灭菌的牙签伸入自己的口腔内壁轻轻刮取黏膜上皮细胞（或在舌头表面刮取细胞），然后将其放入载玻片上的染液中并来回搅动使细胞散开，染色1min左右后小心加盖玻片（尽量避免产生气泡），用滤纸吸去盖玻片周围的液体。

观察：将自制的口腔黏膜上皮细胞标本装片置于显微镜下观察，先用低倍镜观察较分散的、轮廓清晰的黏膜上皮细胞。由于该细胞体积较小、着色较淡，观察时应稍降低视野亮度以便于较快找到目标（在低倍镜下，用碘液染色的细胞呈黄色，用甲苯胺蓝染色的细胞呈淡蓝色，成群或分散分布，形态大小多呈扁平椭圆形）。选择轮廓清晰的细胞移至视野中央，转换至高倍镜下观察。在高倍镜下，可见口腔黏膜上皮细胞外围有一层薄薄的细胞膜，扁圆形的细胞核呈深黄色（碘液染色时）或深蓝色（甲苯胺蓝染色时），细胞质呈浅黄色或浅蓝色，核中央致密的结构为核仁。

#### 2) 洋葱鳞茎内表皮细胞的观察

表皮细胞装片标本的制备：取一干净载玻片，在中央滴一滴碘液，将洋葱鳞茎用小刀分为几块，取一块肉质鳞叶，用刀片在内表皮划“田”字形小方格，每一小方格边长3~4mm，然后用镊子轻轻撕下一小方格的膜质表皮，置于载玻片的碘液滴中铺平，取一干净的盖玻片，将其一侧先接触标本旁的碘液，再缓缓地盖上盖玻片，尽量避免产生气泡，用滤纸吸去盖玻片周围的液体。

观察：将制备好的装片标本放到显微镜下，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，选择其中一个典型的细胞移至视野中央，再转换至高倍镜下仔细观察细胞壁、细胞核、细胞质和液泡等结构。

## 2. 细胞大小的测定

(1) 将显微镜的目镜抽出，除去上面的接目镜，小心地将目微尺（有刻度的一面朝下）放入目镜筒中。

(2) 在目镜下观察目镜测微尺的刻度是否清楚，如果不清楚，说明目镜测微尺不在视野光焦的平面上，需要重新调整，以便可清晰地见到玻璃圆片上的间隔。

(3) 将物微尺（刻度朝上）置于载物台上，使分格位于视野中间，调准焦点可见许多分格，使两种测微尺平行起点线重合，然后找出另一处两尺重合处，记录起点线到重合线之间格尺的刻度数（格数），按式 1.1 计算在该放大系统下目镜测微尺每格所代表的实际长度（图 1.2）。

$$\text{目微尺每格所代表的实际长度}(\mu\text{m}) = \text{物微尺格数} / \text{目微尺格数} \times 10(\mu\text{m}) \quad (1.1)$$

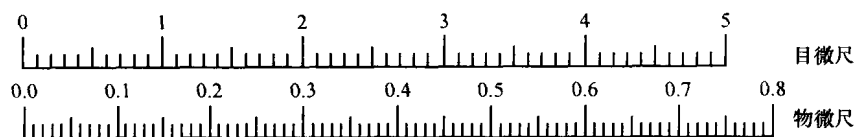


图 1.2 物微尺和目微尺示意图（李芬，2007）

(4) 移去物微尺，换上玻片标本，使得测定的部分位于视野中央，观察测定对象的长度相当于目镜测微尺的几倍。然后将所测知的格数乘以目镜测微尺每格的长度，即为所测标本的长度。

(5) 测量结果计算 [式 (1.2)~式 (1.5)]。

$$\text{椭球形: } V = \frac{4\pi ab^2}{3} \quad (1.2)$$

$$\text{球形: } V = \frac{4\pi R^3}{3} \quad (1.3)$$

$$\text{圆柱形: } V = \pi R^2 h \quad (1.4)$$

$$\text{核质比: } NP = \frac{V_n}{V_c - V_n} \quad (1.5)$$

式中， $V$  为体积； $R$  为球形的半径； $a$  为椭球形的长半径； $b$  为椭球形的短半径； $NP$  为核质比； $V_n$  为核体积； $V_c$  为细胞体积。

### 【作业和思考题】

(1) 将实验观察与计算结果填入表 1.1。

表 1.1 细胞的形态和大小

细胞名称	形态特征	细胞体积	核体积	核质比例

(2) 各种细胞的细胞核大小是否有区别？为什么？

## 实验 2 暗视野显微镜的使用

暗视野显微镜 (dark field microscope) 是为了提高反差而设计的一种光学显微镜。在光的传播过程中, 光线照射到粒子时, 如果粒子的直径大于入射光波长很多倍, 则发生光的反射; 如果粒子的直径小于入射光波长, 则发生光的散射, 这时观察到的是光波环绕微粒而向其四周放射的光, 称为散射光, 从光束的侧面可以看到一条发亮的光柱。微尘在强光直射通过的情况下, 由于强光绕射使人眼不能观察微粒, 而当光线斜射微尘时, 由于光的反射使微粒似乎增大了体积, 微粒为人眼可见, 这种现象称为丁达尔现象 (Tyndall phenomenon)。暗视野显微镜的设计以丁达尔现象为基础, 配置了一种特殊的暗视野聚光器, 其中央装有遮光片, 使光源中心光束不能直接进入物镜, 由于被检物体衍射及反射光可以进入物镜 (图 1.3), 形成了背景黑暗、被检物体轮廓明亮的强烈反差, 从而提高了显微镜的分辨率, 分辨率可达  $0.2 \sim 0.004 \mu\text{m}$ , 可观察小于  $0.1 \mu\text{m}$  的物体和活细胞的运动。配合显微摄影术, 可以记录一个细胞器的运动轨迹, 借以分析其运动方向和速度。但是, 暗视野显微镜因利用样品的反射光和散射光进行观察, 只能观察物体表面存在的运动, 不能分辨物体的微细结构。

暗视野聚光器由聚光镜和光阑组成, 光阑位于聚光镜之下, 中央为较大的圆形遮光挡板, 外周为一环形不可变的透光光阑。暗视野显微镜的聚光器主要有抛物面聚光器 (paraboloid condenser) 和心形聚光器 (cardioid condenser)。抛物面聚光器为一抛物面体, 入射的环状光束经抛物面的反射汇聚于样品处, 并斜向

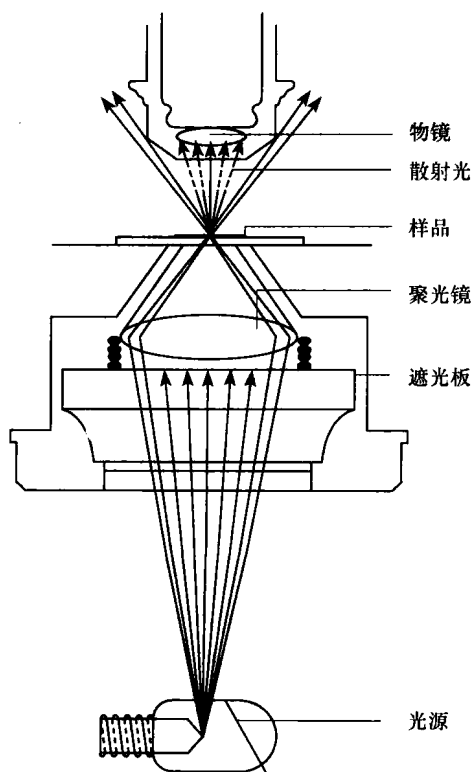


图 1.3 暗视野显微镜的光路图  
(刘江东等, 2005)

照明物体，被检物体反射和散射的光线进入物镜而形成暗视野的背景和明亮的物像；心形聚光器由心形回转面和球面的透镜组成，中央反射面是球面，两侧是心形面，入射光从周缘环状光阑射入，经球面和心形面透镜的反射形成一空心的照明光束，光线经反射汇聚于聚光器上面的被检样品处，样品产生的散射光和反射光进入物镜产生暗视野效果。

### 【实验目的】

掌握暗视野显微镜的原理、构造、使用方法及其用途。

### 【材料、器材和试剂】

材料：未染色的标本、紫叶鸭跖草 (*Setcreasea pallida*) 花丝。

器材：暗视野显微镜或普通复式显微镜和暗视野聚光器、载玻片、盖玻片、刀片、镊子、解剖针、擦镜纸、吸水纸。

试剂：香柏油。

### 【实验方法和步骤】

(1) 把暗视野聚光器转到工作位置或装在载物台下的聚光器支架上，打开光源。

(2) 用镊子从紫叶鸭跖草花丝上取下 1 根表皮毛，制成临时装片，置于暗视野显微镜下观察胞质环流现象；或制作没有染色的装片进行观察。

(3) 在聚光器和载玻片之间加滴一滴香柏油，否则照明光线于聚光镜上面进行全反射，达不到被检物体，从而得不到暗视野照明。

(4) 可稍微调节聚光镜托架的高度，并用滚花螺钉调节中心，以获得最佳效果。

### 【注意事项】

(1) 使用暗视野显微镜时，暗视野聚光器的数值孔径必须大于物镜的数值孔径，否则会因物镜孔径角度大于暗视野聚光器所形成的照明光束中央暗区的角度，致使部分照明光线射入物镜，破坏或降低暗视野效果。

(2) 使用油浸暗视野聚光器时，在聚光镜和载玻片之间滴加香柏油使二者密接，否则将使照明光线在聚光器上面进行全反射，不能到达被检物体。

(3) 载玻片的厚度以 0.8~1.2mm 为宜。因为照明光束经暗视野聚光器后产生空心照明光束（即中心为暗区），反射光的焦点在聚光器透器上面有很短的距离。



- (4) 载玻片和盖玻片须清洁、无划痕。
- (5) 照明光源强度过弱将使照明样品的反射光强度不够而影响观察效果。

### 【作业和思考题】

- (1) 说明暗视野显微镜的原理和主要用途。
- (2) 绘制镜检标本的简图。