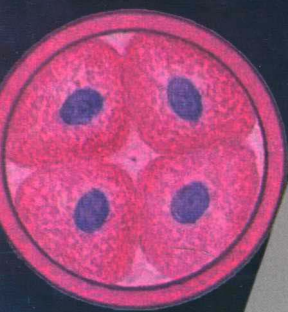


薛良义 主编

# 分子细胞生物学



## 实验指导

Fenzi Xibao Shengwu Xue  
Shiyan Zhidao



科学出版社

第 2 版

# 分子细胞生物学

## 实验指导



第 1 版 2008 年 12 月

# 分子细胞生物学实验指导

薛良义 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本教材是我校国家特色专业——水产养殖专业课程建设的成果之一。本教材内容分两篇，第一篇为细胞生物学技术，包括细胞的形态结构观察、细胞生理生化技术、细胞培养和细胞工程技术等；第二篇为分子生物学技术，包括基因组 DNA 的提取、基因克隆技术和蛋白质分析技术等。较完整地介绍了目前在水产领域研究中应用的分子和细胞生物学技术，各篇内容既涵盖基础性的实验，又包括综合性的实验，在学生掌握实验技术的基础上，培养学生对实验结果的分析能力。为结合专业特点，本书侧重以水产生物为实验材料。

本教材可供水产专业、生命科学相关专业本科生和研究生使用，也可作为相关研究人员的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

分子细胞生物学实验指导 / 薛良义主编. —北京: 科学出版社, 2012.7  
ISBN 978-7-03-034848-7

I. ①分… II. ①薛… III. ①分子生物学 - 细胞生物学 - 实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第128720号

责任编辑: 陈 露 封 婷 孙 青 / 责任校对: 宣 慧  
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 靛

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>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012年7月第 一 版 开本: B5(720 × 1000)

2012年7月第一次印刷 印张: 11

字数: 203 000

定价: 23.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

# 《分子细胞生物学实验指导》

## 编辑委员会

主 编 薛良义

副主编 龚一富

编 委 (按姓氏笔画排序)

杨 锐 余红卫 沈锡权 罗丽丽

竺俊全 於 宏 贾永红

# 前 言

分子生物学和细胞生物学既是现代生命科学的核心学科，又与医学、农业和水产等领域的关系十分密切。作为 21 世纪生物学及相关专业的学生，必须了解分子生物学和细胞生物学的基本概念、理论以及发展，熟悉分子生物学和细胞生物学的基本实验技术。虽然在课程设置上，分子生物学和细胞生物学是两门独立的课程，但在科学研究上，分子生物学技术和细胞生物学技术早已互相渗透、互相融合。面对学科的发展和新的要求，我们在生物工程、水产养殖等专业开设分子生物学和细胞生物学理论课的同时，开设了分子细胞生物学实验课，并在宁波大学教材建设项目和国家特色水产养殖专业建设项目的资助下编写了本教材。

本教材分细胞生物学技术和分子生物学技术两篇。内容上，细胞生物学技术篇包括细胞的形态结构观察、细胞器的分离、细胞膜生理、细胞化学、细胞凋亡的检测及细胞工程技术等；分子生物学技术篇包括核酸的提取、PCR 及基因克隆、分子杂交、转基因和蛋白质电泳等。实验类型上，每篇都含有基础性实验、综合性实验和研究性实验，有利于学生学习基本实验技术以及初步训练科学研究能力。本教材是一本集基础性和研究性为一体的实验教材，在注重细胞生物学和分子生物学实验体系的基础上，结合教师的科研工作，适当融入了水产特色，使学生在在学习分子生物学和细胞生物学实验技术的同时，熟悉这些技术在水产科学研究中的应用，培养学生的科研兴趣和能力。本教材可供水产相关专业和生命科学相关专业的本科生和研究生使用，也可供水产科学研究人员使用。

本教材由宁波大学的沈锡权、於宏、余红卫、龚一富、竺俊全、罗丽丽、杨锐、薛良义和浙江万里学院的贾永红等教师共同编写完成。其中实验 1、实验 3、实验 11 由沈锡权编写，实验 2、实验 6~10、实验 12 由於宏编写，实验 4 和实验 5 由余红卫编写，实验 13~16、实验 18~20、实验 24~25、实验 31、实验 35~37、实验 43~44 由薛良义编写，实验 17、实验 26、实验 28~29、实验 32、实验 38~40、实验 42 由龚一富编写，实验 21 由贾永红编写，实验 22~23 由竺俊全编写，实验 27、实验 45~46 由罗丽丽编写，实验 30、实验 33~34 由龚一富和薛良义共同编写，实验 41 由杨锐编写。限于编者的水平，本教材的框架体系和具体内容难免存在不足和疏漏之处，希望读者批评指正。

编 者

2012 年 2 月

# 目 录

## 前言

## 第一篇 细胞生物学技术

实验 1	细胞形态观察及显微测量	3
实验 2	光学显微标本的制备与观察	5
实验 3	相差和荧光显微镜的使用	9
实验 4	透射电子显微镜及细胞超微结构观察	13
实验 5	扫描电子显微镜及细胞表面结构观察	16
实验 6	细胞骨架的观察	18
实验 7	细胞核和线粒体的分离及鉴定	20
实验 8	叶绿体的分离与观察	22
实验 9	细胞膜的通透性	25
实验 10	植物凝集素对红细胞的凝集作用	27
实验 11	细胞电泳	29
实验 12	细胞吞噬的观察	32
实验 13	鱼类血细胞微核的诱导	34
实验 14	细胞内 DNA 及 RNA 的显示	37
实验 15	动物细胞原代培养	39
实验 16	动物细胞传代培养	43
实验 17	原生质体的分离和培养	48
实验 18	细胞凋亡的诱导和检测	51
实验 19	细胞融合的诱导	53
实验 20	重金属离子对鱼类细胞活性的影响	57
实验 21	动物骨髓细胞染色体的制备	59
实验 22	鱼类精子的超低温冷冻保存	62
实验 23	单细胞凝胶电泳	64
实验 24	荧光原位杂交	67

## 第二篇 分子生物学技术

实验 25	鱼类基因组 DNA 的提取	73
实验 26	植物基因组 DNA 的提取	77
实验 27	细菌基因组 DNA 的提取	83
实验 28	DNA 酶切及凝胶电泳	86
实验 29	Southern 杂交	89
实验 30	基因的 PCR 扩增	95
实验 31	感受态细胞的制备	98
实验 32	质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定	100
实验 33	PCR 扩增产物的纯化及克隆	103
实验 34	RNA 的提取与检测	107
实验 35	逆转录 PCR 法检测基因的表达	111
实验 36	cDNA 克隆及原核表达	114
实验 37	重组蛋白的检测	117
实验 38	Northern 杂交	121
实验 39	RACE 技术	125
实验 40	定量 PCR 技术	130
实验 41	应用基因枪法进行藻类遗传转化	136
实验 42	农杆菌介导的植物遗传转化技术	140
实验 43	基因组步移	146
实验 44	启动子功能分析	149
实验 45	蛋白质双向凝胶电泳	153
实验 46	同工酶电泳分析	159
参考文献		163
附录	实验室规则	164



# 第一篇 细胞生物学技术



# 实验 1 细胞形态观察及显微测量

## 【实验目的】

学习和掌握在普通光学显微镜下测量细胞大小的方法。

## 【实验原理】

细胞长度、面积、体积的测量是研究正常的或病理组织细胞的基本方法之一。在显微镜下用来测量细胞长度的工具叫显微测量计，由目镜测微尺(ocular micrometer)和镜台测微尺(stage micrometer)组成，两尺要配合使用。目镜测微尺是放在目镜内的一直径为 2cm 的圆形玻片，圆形玻片正中央有 100 等分格的刻度尺。每一小格表示的实际长度随不同的显微镜、不同放大倍数的物镜而不同。镜台测微尺是一块特制的载玻片，在它的中央由一片圆形盖片封固着一具有精细刻度的标尺，标尺全长为 1mm，分为 100 等份的小格，每小格的长度为 0.01mm(10 $\mu$ m)，标尺的外围有一小黑环，便于找到标尺的位置。显微测量时，先用镜台测微尺标定目镜测微尺每小格所表示的实际长度。在测量细胞时，移去镜台测微尺，换上被测标本，用目镜测微尺即可测得观察标本的实际长度。

## 【实验材料、器具和试剂】

### 1. 材料

鲫鱼、蛙和人血涂片。

### 2. 器具

显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺。

## 【实验步骤】

### 1. 细胞大小的测量

(1) 取下目镜，将目镜测微尺的刻度面向下放入目镜内的视场光阑上，再旋上目镜。

(2) 将镜台测微尺盖片面朝上放在载物台上，用低倍镜观察，调节焦距看清镜台测微尺的刻度。

(3) 移动镜台测微尺，同时转动目镜，使目镜测微尺与镜台测微尺平行靠近，并将两尺的“0”点刻度线或某刻度线对齐。然后从左向右查看两尺刻度线另一重合处，分别记录重合线间目镜测微尺和镜台测微尺的格数。以下式计算目镜测微尺每小格表示的实际长度：

目镜测微尺每小格实际长度 = 镜台测微尺格数  $\times$  10  $\mu$ m / 目镜测微尺格数

(4) 移去镜台测微尺，换上不同生物的血涂片，用目镜测微尺测量细胞所占

小格数并乘以目镜测微尺每小格代表的实际长度，即为被测细胞的实际长度。如果细胞是椭圆形的，分别测量其长径和短径。

### 2. 厚度测量法

测量细胞的厚度，最简便的方法是利用显微镜上的微调焦轮上的标尺对细胞厚度进行测量。先将焦点面与被测物体的上端对齐一致，记下轮上的刻度数，然后旋转微调焦轮，使焦点面与下端对齐一致，再记下刻度数，两者之差，便是所测物体的厚度。此法简单但不精确。

### 3. 观察细胞及细胞器的形态结构

观察和比较这三种不同生物血细胞的形态和结构。

### 【注意事项】

1. 需要换用高倍镜或油镜测量时，要用同样的方法重新计算高倍镜或油镜下目镜测微尺每小格的实际长度。

2. 在测量时要注意将被测物体放在视野中央，因为这个位置镜像最清晰，相差最小。

3. 每一种被测物体(细胞)需反复测量几个或几十个，采用其平均值。

### 【作业与思考】

1. 各测量 10 个鲫鱼、蛙和人红细胞的长度和宽度，求其平均值。

2. 根据测量结果写实验报告。

## 实验 2 光学显微标本的制备与观察

### 【实验目的】

理解石蜡切片法各主要步骤的基本原理，熟悉各种试剂的配制和各种器材的使用方法，学习制作动物组织切片及染色技术。

### 【实验原理】

生物体大部分都是不透明的，不能直接在显微镜下观察。要在显微镜下观察其内部的微细结构，必须采用各种特殊的方法对材料进行处理，把材料制成玻片标本，使光线能透过，才能置于显微镜下观察和了解它们的微细结构。

石蜡切片是组织学常规制片技术中应用最广泛的方法。它不仅用于观察正常细胞组织的形态结构，而且是病理学和法医学等学科用以研究、观察及判断细胞组织的形态变化的主要方法，已相当广泛地用于其他许多学科的研究中。

显微制片首先要尽量保持生物材料的天然状态，避免变形和失真。因此须将生物材料做固定处理；制片必须薄而透明，才能在光学显微镜下成像。除将材料切成薄片或通过轻压或其他手段使之分散外，还需采用其他方法使其透明和染色，以便更好地观察到结构的细节。需长期保存的制片，还应进行脱水和封固。

染色的目的是使细胞组织内的不同结构呈现不同的颜色以便于观察。未经染色的细胞组织其折光率相似，不易辨认。经染色可显示细胞内不同的细胞器和内含物以及不同类型的细胞组织。染色剂种类繁多，应根据观察要求及研究内容采用不同的染色剂及染色方法，还要注意选用适宜的固定剂才能取得满意的结果。经典的苏木精(hematoxylin)-伊红(曙红, eosin)染色法是组织学标本及病理切片标本的常规染色法，简称 HE 染色。经 HE 染色后，细胞核被苏木精染成紫蓝色，多数细胞质及非细胞成分被伊红染成粉红色。由于苏木精是带阳离子的染料，染液呈碱性，核内染色质及胞质内核糖体等物质对这种染料有亲和性，称嗜碱性；而带阴离子的伊红配制的染液呈酸性，对这种染料具亲和性，称嗜酸性。有时不同的组织结构还需要用特殊的染料及染色方法加以显示，称特殊染色。

### 【实验材料、器具和试剂】

#### 1. 材料

鲫鱼。

#### 2. 器具

解剖盘、解剖剪、解剖针、镊子、纱布、切片机、包埋机、烤片机、毛笔、载玻片、盖玻片、烤箱、显微镜、染色缸、烧杯、量筒。

### 3. 试剂

(1) Bouin 液：饱和苦味酸水溶液：甲醛：冰醋酸为 15：5：1。

(2) 蛋白甘油：取鸡蛋蛋白充分搅匀，过滤，取滤液 10ml，加甘油 10ml 混匀，再加少量防腐剂(如麝香草酚)混合即成。

(3) Delafield 苏木精

甲液：苏木精 1g，无水乙醇 6ml

乙液：饱和铵明矾水溶液(约 10%)100ml

丙液：甘油 25ml，甲醇 25ml

先将苏木精溶于乙醇，再将甲液混合在乙液中，置于白色瓶中并暴露在阳光下约 1 周，然后过滤，将丙液加入滤液中，待溶液呈暗灰色时再过滤，滤液密封保存。

(4) 伊红乙醇溶液：伊红 0.25g；95%乙醇 100ml。

(5) 其他试剂：95%乙醇、无水乙醇、盐酸、二甲苯、石蜡、中性树脂、生理盐水等。

### 【实验步骤】

#### 1. 取材

取鲫鱼肝、肾组织，切成长、宽、高各 2~5mm 的小块，用生理盐水洗净。

#### 2. 固定

上述组织块用 Bouin 液固定 24h。

#### 3. 洗涤

固定之后，组织中的固定液必须冲洗干净。冲洗的方法根据固定液的性状而确定，固定液为水溶液的常用水冲洗；含有乙醇的用 50%乙醇或 70%乙醇冲洗；含苦味酸的则用 70%乙醇冲洗 2 次，每次 30min。

#### 4. 脱水

固定的组织经洗涤后，按下列程序进行脱水：70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇各 10~20min，无水乙醇(I)和无水乙醇(II)各 30~40min。

为了使材料能为石蜡所浸透，必须将水移去，换成能溶解石蜡的有机溶剂，如二甲苯等。在制片中常用的脱水剂是乙醇(酒精)，将浸在水中的材料依次从低浓度移到高浓度的乙醇中，最后移到无水乙醇中完成脱水。

#### 5. 透明

无水乙醇：二甲苯(1：1)30min，二甲苯(I)和二甲苯(II)各 20min。

无水乙醇不能与石蜡相溶，还需用能与乙醇和石蜡相溶的媒浸液，替换出组织内的乙醇。材料块在这类媒浸液中浸渍，出现透明状态，此液即称透明剂，透明剂浸渍过程称透明。常用的透明剂有二甲苯、苯、氯仿、正丁醇等，各种透明剂均是石蜡的溶剂。

## 6. 浸蜡与包埋

在55~60℃下,组织块在二甲苯:石蜡(1:1)、石蜡(I)和石蜡(II)中各置30min。用熔化的石蜡取代二甲苯,使材料逐步为纯石蜡所浸透。

然后将材料连同熔化的石蜡,倒入小纸盒中,在室温下或在冷水中使包埋有材料的蜡块迅速凝固。浸蜡和包埋的目的是使材料借石蜡的支持能被切成薄片。

## 7. 切片、贴片

修整蜡块、切片,用蛋白甘油贴片,贴好的切片置于37℃恒温箱内干燥2~3h。贴片时,用蛋白甘油作为黏附剂,将展平的蜡片黏附于载玻片上,以免在以后的脱蜡、水化及染色等步骤中两者脱离。

## 8. HE染色、封片

干燥后的切片需脱蜡及水化才能在水溶性染液中进行染色。用二甲苯脱蜡,再逐级经无水乙醇及梯度浓度乙醇直至蒸馏水。染色后的切片尚不能在显微镜下观察,需经梯度浓度乙醇脱水、二甲苯透明后,滴加适量(1~2滴)中性树脂,封片后即制成永久性玻片标本,在光镜下可长期反复观察。

将干燥的切片放入染色缸中,按下列程序进行染色和封片:二甲苯脱蜡10~20min,无水乙醇:二甲苯(1:1)、无水乙醇(I)、无水乙醇(II)、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇和50%乙醇各3~5min;蒸馏水洗片刻,苏木精染10~15min(随时镜检),自来水洗10min(切片显示蓝色),置1%盐酸乙醇中分色数秒(切片变红,颜色变浅即可),自来水洗数秒,蒸馏水洗2次;然后置70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇和95%乙醇各3~5min,伊红Y染色30~60s;95%乙醇、无水乙醇(I)和无水乙醇(II)各3~5min,无水乙醇:二甲苯(1:1)8~10min,二甲苯(I)和二甲苯(II)各5min;中性树脂封片。

## 9. 观察

观察组织及细胞结构。

### 【注意事项】

#### 1. 取材

应根据要求选取材料来源及部位。材料必须新鲜,搁置时间过久则使蛋白质分解变性,导致细胞自溶及细菌的滋生,而不能反映组织活体时的形态结构。切取的组织块不能太大,否则不利于固定液迅速渗透组织块。

#### 2. 固定

用适当的化学药液——固定液浸渍切成小块的新鲜材料,迅速凝固或沉淀细胞和组织中的物质成分,终止细胞的一切代谢过程,防止细胞自溶或组织变化,尽可能保持其活体时的结构。固定能使组织硬化,有利于切片的进行,而且也有媒浸作用,有利于组织着色。固定液的种类很多,其对组织的硬化收缩程度以及对组织内蛋白质、脂肪、糖类等物质的作用各不相同。因此,应根据所要显示的

内容来选择适宜的固定液。

**【作业与思考】**

1. 总结和分析实验过程中遇到的问题及其解决方法。
2. 分析影响 HE 染色的主要因素。



## 实验 3 相差和荧光显微镜的使用

### 【实验目的】

熟悉相差和荧光显微镜的原理、构造及使用方法。

### 【实验原理】

相差显微镜(phase contrast microscope)是能将物体本身的相位差(或光程差)转换为振幅(光强度)变化的显微镜。人的眼睛只能鉴别可见光的波长和振幅的变化,但活的生物多为无色透明,当光线通过时,波长和振幅很少发生变化,而生物材料各部分之间以及环境之间往往有折射率的差别,光线透过后可产生相位的改变。

当光波通过活细胞的折射率不同的部位时,一部分仍为相位和振幅相同的直射光,另一部分由于光的衍射现象向周围发散出衍射光。当直射光和衍射光同时到达一点时,两者互相干涉,形成合成波,合成波的强度取决于两光波的振幅和相差。为了利用两种光波的干涉,在相差显微镜中设有两个特殊的装置——环状光阑与相板。直射光一般比衍射光强很多,为了让衍射光对直射光有影响,要使直射光强度减弱。环状光阑与相板中环状金属涂料在光路中重叠(即同轴、同轴环)后,直射光经金属吸收,强度减弱到和衍射光差不多。相板的其余部分为比较厚的透明材料,使衍射光产生光程差的作用。一般设计为光程差  $1/4$  周期(即  $\pi/4$ )的厚度。假定其生物样品能使经过它们的光产生  $\pi/4$  的光程差,这样的两个  $\pi/4$  相加使衍射光产生  $\pi/2$  的光程差。这时经过样品的衍射光和不经过样品的直射光正好为波峰和波谷相遇,振幅为零,则样品呈黑暗。而某些生物样品若使衍射光推迟光程为  $3\pi/4$ ,再加上相板推迟的  $\pi/4$ ,和直射光的光程相差正好为  $\pi$ ,即正好为波峰与波峰相遇,合成波有 2 倍的振幅,样品区为最明亮。一般生物样品中各种结构推迟光程的能力不同,但都在上述两个极端之间,这样就会出现明暗程度不同的差别。

在一台明视野显微镜上,装入具有环状光阑的聚光器和具有相板的相差物镜,就成为一台相差显微镜。环状光阑是一个不透明的玻璃圆盘,中间有一个透明的圆环,使光线只能从这圆环中通过。具有环状光阑的聚光器称为相差聚光器,相差聚光器设有几个直径不同的环状光阑,分别对应于不同放大倍数的相差物镜。相板位于物镜后焦平面上,在一个透明圆盘中有一暗色圆盘,整个相板涂有相位推迟物质,使通过环状光阑经标本后产生的衍射光、散射光的相位推迟  $1/4$  波长,这样若物体使直射光比衍射光超前  $1/4$  波长,合起来有  $1/2$  波长的正相差,干涉结果使物体像变暗而背景变亮,暗相差结果则相反。暗色圆环部分还涂有光吸收物