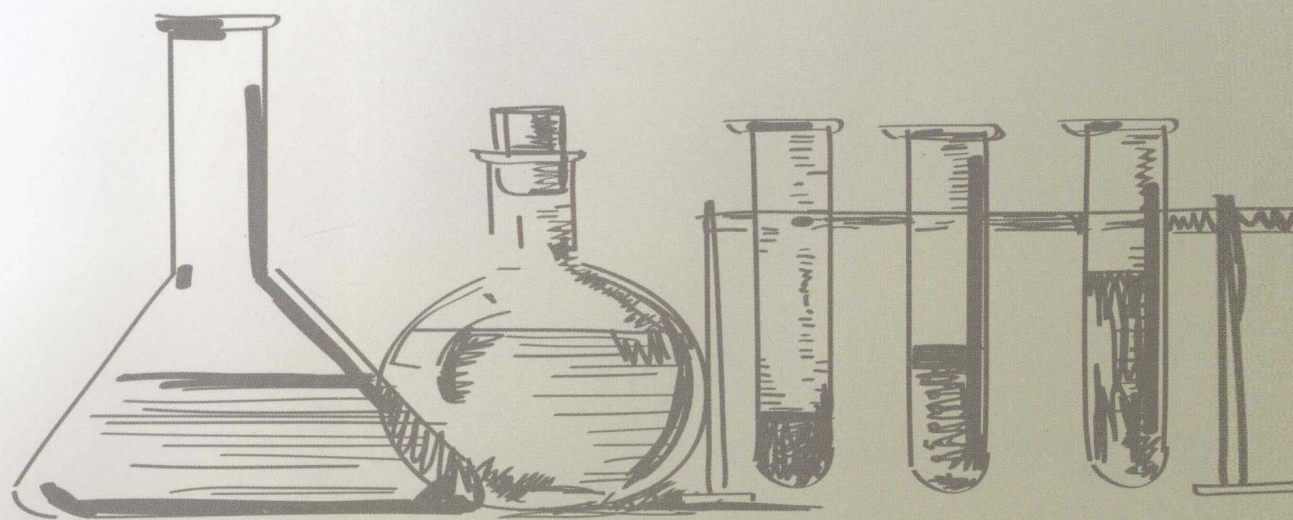


现代生命科学实验系列丛书

丛书主编 杨永华 杨荣武

实用细胞生物学实验

● 薛雅蓉 张 晶 华子春 编著



科学出版社

现代生命科学实验系列丛书

丛书主编 杨永华 杨荣武

实用细胞生物学实验

薛雅蓉 张 晶 华子春 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是一本内容丰富、编排新颖、语言通俗易懂的细胞生物学实验教材。内容包括三大部分：第一篇为细胞生物学现代仪器介绍，主要介绍细胞生物学实验所涉及的一些先进的实验仪器的原理与使用领域、使用方法；第二部分为细胞生物学常用实验技术，包括细胞制片技术，细胞分离、纯化技术，免疫组化技术等；第三部分为实用细胞生物学实验，内容涵盖了细胞结构与组成、细胞分离、细胞组分分离、细胞生理与病理、细胞遗传、细胞培养与细胞工程等精选的代表性实验，特点是用时较短、步骤翔实、结果可控、能够在正常教学时间段完成、可用作日常教学学生实验。

本书主要针对高等院校生物学相关专业本科生细胞生物学实验教学编写，可用作教师及学生的细胞生物学实验教材或参考书。

图书在版编目(CIP)数据

实用细胞生物学实验/薛雅蓉，张晶，华子春编著. —北京：科学出版社，2012.10
(现代生命科学实验系列丛书/杨永华，杨荣武主编)

ISBN 978-7-03-035692-5

I. ①实… II. ①薛…②张…③华… 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 (2012) 第 234538 号

责任编辑：张 鑫 顾晋怡 胡 凯/责任校对：包志虹

责任印制：赵德静/封面设计：许 瑞

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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年1月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2013年1月第一次印刷 印张：12

字数：242 000

定价：38.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《现代生命科学实验系列丛书》编委会

主 编 杨永华 杨荣武

副主编 姜建明 丁 益 庞延军 谢 民 孔令东

《实用细胞生物学实验》编委会

主 编 薛雅蓉 张 晶 华子春

编 委 张远莉 李 俊 仲昭朝 庄 重 高倩倩

庄苏星 彭士明 康铁宝

从 书 序

20 世纪后半叶是生命科学迅猛发展的时代,尤其是最后 20 年,其发展速度之快更加令人瞩目。基因治疗方法已经开始挽救患者的生命,动物克隆技术不断取得重大突破,利用基因工程技术生产新药和新型生化产品、培育农作物新品种业已成为相关产业发展的重要支撑技术,如此等等,人类数千年来的梦想正随着生命科学发展逐一实现。随着物理学世纪让位于生命科学世纪,世界还将会有更多的奇迹出现。可以预计,在本世纪,生命科学将成为自然科学的带头学科之一。

众所周知,始于 1990 年的人类基因组计划,动用了美、欧、亚多国的数百名科学家,计划耗资 30 亿美元,最终目标是绘制出人体 10 万个基因的图谱,揭开 30 亿个碱基对的密码,弄清全部基因的位置、结构和功能。这项工程为揭开有关人体生长、发育、衰老、患病和死亡的秘密,为最终帮助人类攻克诸如癌症、艾滋病、肝炎、肺结核、阿尔茨海默氏症等许多传统医学无法解决的难题,提供了十分有益的途径和可选择的方法。目前,各个种类的生物基因组计划、蛋白组学、代谢组学等“组学”计划如雨后春笋,层出不穷,方兴未艾,大量的新型生命科学仪器设备、实验技术不断得到发展和发明。时代的发展使人们越来越清楚地意识到,现代生命科学的探索不仅需要系统的理论知识武装,而且作为实验科学范畴的生命科学更需要比较完善的有关实验操作的系统性训练和实践,从而为科技工作者的科研创新打下坚实的基础。

南京大学的生命科学实验教学改革与发展一直走在全国高校的前列,特别是在南京大学生命科学实验教学中心成为国家级实验教学示范中心以后,始终按照“宽口径、厚基础、高素质、重创新”的原则,改善实验课程体系,更新实验教学内容,重视并加强学生思维和操作技能的训练,力争将学生培育成既具见识宽广的基础知识和生命科学核心知识,又有一定的生命科学技术的高级人才。通过这几年的教学实践,他们已积累和沉淀出相当多的经验和成果,这些经验和成果迫切需要总结,并以教材的形式出版,从而让兄弟院校的师生能够分享,同时在互动教学实践中获取宝贵的意见,以便不断改进现代生命科学的实验教学。我很高兴该丛书作为现代生命科学实验教学系列教材得以在科学出版社出版。这套丛书的出版完全顺应了当今生命科学从微观到宏观,从结构到功能,交叉与整合的发展趋势,是以杨永华教授、杨荣武教授为团队带头人的各位作者们多年来从事该项工作的心得并加以不断总结的产物,也是他们所倡导的“系统性整合生命科学教学与实验体系”在大学生物学教学与改革方面的具体实践结果。

该丛书所倡导并实践的实验教学体系,总体上是一套守正创新的体系。围绕该课程体系,分层次、分模块,系统设置了生命科学实验课程,重组了本科实验教学的基本内容,加强开放式、综合性、研究型实验,深化基础生物学技术训练、中级生物学技术训练、综合性技能与研究性实验训练。在新编的系列丛书中尤其注意去除一些过时的实验技术,将过去实验教学过程中的单一技能训练转化为综合实验技能训练,在实验课程体

系和内容的设置方面以系统综合大实验为核心并以科学研究思路为线索设计系列教学实验，让学生在实验课程中体验科研的过程，使学生从整体上了解进行生物科学研究的思路和方法，培养学生正确的科研思维能力和综合素质。

我相信该丛书的出版将十分有助于提升我国高校生物学专业大学生及部分重点高中学生的科学意识、学习兴趣和创新能力，对大中学生未来的成长和国家培养创新型人才具有积极的意义。期待全国的大中学生们努力开拓视野、相互学习、共同进步，使自己的生命科学知识和生物科研水平达到一个新的高度。



中国工程院院士
中国生物工程学会理事长
江苏省科学技术协会主席

2012年7月30日

丛书前言

培养大学生的创新实践能力已成为当前我国高等教育教学改革的核心目标之一，也是促进我国高等教育可持续发展的永恒动力。21 世纪被誉为生命科学的世纪，在已过去的十多年里，我们已经领略了生命科学日新月异的发展态势。作为一门实验性很强的学科，生命科学的发展显然离开不了实验教学的发展和进步。让学生拥有一套与时俱进的基于创新理念的生命科学实验教材，对于保证实验教学的质量，特别是提高学生将来在生命科学研究中的动手能力和创新能力至关重要。在高校，创新的源头在实验室。但实验室提供的不只是单纯的实验仪器，更重要的是丰富、先进的实验项目和内容。

这套现代生命科学实验系列丛书就是在这样浓烈的时代、使命和责任感的背景下编写完成的。“十一五”期间，在教育部及学校有关部门的大力支持下，南京大学国家级生命科学实验教学示范中心提出并建立了“系统性整合生命科学教学与实验体系”，通过数年的实施和完善，中心已取得了一批有特色的教学研究心得和成果。为便于全国兄弟高校之间的相互交流，提高生物学实验教学水平，在科学出版社的积极关心下，本中心精心组织了一批长期奋战在实验教学一线的专家和教师，编写了这套实验丛书。这套丛书将覆盖生命科学的诸多学科，以结构和功能为主线，涵盖从微生物、植物到动物、人类对象，从分子、细胞到个体、群体层次等多个方面，先行出版的有高级生物化学实验、生化分析技术实验、实用细胞生物学实验、遗传学实验、基因工程实验、植物科学实验等。每一分册的内容先从各门课程的基本技能训练入手，以培养学生掌握基本的研究手段，强化提高其综合运用，最后能独立完成创新课题为主线，包括基础实验、综合实验和创新实验。其中的创新实验部分，既包含在新的条件下再现大科学家经典实验的项目，又有与生活实际相联系的实验项目。书中涉及的主要实验原理和技术方法被直接融入到具体的实验之中，这样既便于学生掌握，又避免了理论与实际相脱离的弊端。

本丛书的编写风格简明、实用，编写中特别突出实验的综合性和创新性。在编写过程中，去除了一些过时的实验技术，将过去实验教学过程中的单一技能训练转化为综合实验技能训练，在实验课程体系和内容的设置方面以系统综合大实验为核心并以科学研究思路为线索设计系列教学实验，让学生在实验课程中体验科研的过程，使学生从整体上了解生命科学研究的思路和方法，培养学生正确的科研思维能力和综合素质。

最后，我们要特别提及的是，全国兄弟院校的一些专家、学者，南京大学生命科学学院及其国家级生命科学实验教学示范中心的同事，全国部分重点高中生物老师、生物竞赛教练员，通过多种途径和方式，给予了我们有力的支持和帮助，在此一并表示衷心的感谢。

由于时间仓促，书中难免有疏漏和不当之处，希望读者在使用过程中能提出批评和建议并反馈编者，以使本丛书日臻完善。

丛书主编
国家级生命科学实验教学示范中心
南京大学生命科学学院
2012年7月25日

前 言

细胞生物学是现代生命科学的前沿分支学科之一,是现代医学、生物技术、畜牧、水产等专业的重要基础学科。因此,细胞生物学理论及实验教学成为生命科学相关专业本科教学体系中的必修、核心课程,有着举足轻重的地位。细胞生物学是一门实验学科,实践性强。实验课教学不仅有助于加深学生对细胞学知识与理论的学习和理解,还能够培养学生的研究与创新能力,具有理论课无法替代的重要作用,是提高学生综合素质的有效途径。要完成细胞生物学实验教学应有的教学目标,一本好的教材至关重要。

作为实验教材,实用性和可操作性是至关重要的。实用性是指所列的实验内容应该大部分是绝大多数高校有条件且能够在正常教学 2~3 个学时的时间段内完成的;可操作性指实验材料选择得当、实验方法可靠、实验步骤翔实。

编者从事细胞生物学实验教学十几年,积累了一些实验教学的心得和经验,希望编写一本具有如下特点的细胞生物学实验教材:①内容丰富,兼具基础性、应用性与创新性;②结构合理,便于阅读及教学选择;③语言通俗易懂,实验方法、操作步骤及注意事项描述详细而清楚,便于应用;④能够扩大学生知识面、启发学生思考。适逢南京大学国家级生命科学实验教学示范中心拟出版具有自身特点的一系列生物学实验教材,此书便应运而生。

在本书编写过程中,首先对内容进行了精选,使其既能反映细胞生物学领域的基本研究范围、基础实验技术、常用实验仪器,又能对细胞生物学领域的新方法、新仪器与新应用有所体现。第一篇为细胞生物学现代仪器介绍,主要介绍细胞生物学实验所涉及的一些先进的实验仪器的原理与使用领域、使用方法;第二篇为细胞生物学常用实验技术,包括细胞制片技术,细胞分离、纯化技术,免疫组化技术等;第三篇为实用细胞生物学实验,内容涵盖了细胞结构与组成、细胞分离、细胞组分分离、细胞生理与病理、细胞遗传、细胞培养与细胞工程等精选的代表性实验。

本书注重实验的可操作性。书中所描述的实验方法多数经过我们的验证,并且,其中的一些实验方法还进行过优化;对于少数我们自己未做过的实验,通过广泛查阅相关书籍及科研文献,相互印证互补,尽量使其可行。

本书还注重实验背景知识与应用领域的介绍,并通过提供参考文献扩大学生的知识面,列出问题启发学生思考。

在编写这本实验教材的过程中,我们始终本着认真负责的态度,努力希望达到预期的目标。但是,因为编者的水平和能力等诸多方面的缺陷和限制,书中难免存在错误和问题,恳请读者提出宝贵意见和建议,以便我们修正和完善。

薛雅蓉

2012 年 3 月

目 录

丛书序	
丛书前言	
前言	

第一篇 细胞生物学现代仪器介绍

第1章 相差显微镜的工作原理及应用	3
第2章 透射电子显微镜的原理及其在细胞生物学中的应用	6
第3章 流式细胞仪原理及应用	8
第4章 激光扫描共聚焦显微镜原理及应用	13

第二篇 细胞生物学常用实验技术

第5章 细胞制片技术	21
第6章 细胞分离纯化技术	27
第7章 细胞培养技术	31

第三篇 实用细胞生物学实验

一、细胞结构与组成显示实验

实验1 动物细胞血涂片的制备、瑞氏染色及细胞观察	41
实验2 细胞大小的显微测量	45
实验3 线粒体及液泡系的活体染色	47
实验4 甲基绿-派洛宁染色法显示细胞中的DNA和RNA	50
实验5 洋葱鳞茎内表皮细胞DNA的福尔根显示	52
实验6 细胞中多糖和脂肪的染色显示	54
实验7 考马斯亮蓝染色法显示细胞骨架	56
实验8 免疫荧光染色法显示培养细胞的微管	59
实验9 巨噬细胞酸性磷酸酶的显示	62
实验10 细胞中过氧化氢酶的显示	65

二、细胞分离实验

实验11 聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度分离液分离血液单个核细胞	69
实验12 Percoll不连续密度梯度离心法分离NK细胞	72

三、细胞组分分离实验

实验 13	红细胞质膜的制备	77
实验 14	肝细胞质膜的制备	80
实验 15	植物叶绿体的分离、观察及活性检测	82
实验 16	动物肝组织线粒体的分离实验	84
实验 17	大豆叶片细胞线粒体的分离纯化	87
实验 18	细胞中期染色体的分离	89

四、细胞生理与病理检测实验

实验 19	哺乳动物红细胞膜的通透性	95
实验 20	质壁分离法测定植物基态渗透值	97
实验 21	小鼠腹腔巨噬细胞吞噬现象观察及吞噬活性检测	99
实验 22	台盼蓝 (trypan blue) 染料排除法鉴定死活细胞	102
实验 23	MTT 比色法检测细胞活力与细胞数量的关系	104
实验 24	涂片染色法观察骨髓自然凋亡细胞	108
实验 25	Hoechst-PI 染色法检测抗癌药物诱导的腹水瘤凋亡细胞	110
实验 26	Annexin V-FITC/PI 双染色法检测凋亡细胞	112
实验 27	细胞微核检测实验	115

五、细胞染色体制备与分析实验

实验 28	压片法制备植物根尖细胞有丝分裂标本	123
实验 29	花粉母细胞减数分裂标本制备	126
实验 30	压片法制备动物精巢组织减数分裂染色体标本	129
实验 31	滴片法制备动物单细胞悬液染色体标本	131
实验 32	去壁低渗法制备植物细胞染色体分散标本	135
实验 33	人类染色体的 G 显带实验	138
实验 34	植物根尖染色体的 Giemsa C 显带实验	141
实验 35	人类染色体核型分析实验	144

六、细胞培养相关实验

实验 36	鸡胚成纤维细胞的原代培养实验	149
实验 37	外周血淋巴细胞的原代培养实验	154
实验 38	鸡胚成纤维细胞的传代培养实验	157
实验 39	腹水瘤细胞冻存与解冻复苏实验	159
实验 40	植物原生质体的制备与培养实验	163

七、细胞融合及细胞转基因实验

实验 41	PEG 介导的细胞融合实验	169
实验 42	哺乳动物细胞基因转染实验	172
附录	缩略语对照表.....	177

第一篇 细胞生物学现代仪器介绍

第 1 章 相差显微镜的工作原理及应用

描述光线特征的指标有三个：波长、振幅和相位。波长可通过颜色表现出来，振幅可通过明暗显示出来，这两种差别人眼都可以分辨。但光线通过密度不同的透明标本时往往只产生相位变化（到达眼睛的时间），这种变化肉眼难以分辨。1935 年，荷兰科学家 Zernike 发明了一种称之为相差显微镜（phase contrast microscope）的特种显微镜，能够利用其不同于普通显微镜的一些装置将相位差转换为振幅差，从而使不能被分辨的相位差变成能够被观察的光强差。

1.1 相差显微镜的组成及工作原理

相差显微镜有三个不同于普通显微镜的构件：环状光阑、相板、合轴调节望远镜。

环状光阑是具有环形开孔的光阑，安装在载物台下的一个转盘上。一般有数个、对应不同放大倍数的物镜。环状光阑上的环形开孔（在合轴调节望远镜中观察时呈亮环）可使入射光线以近乎同一相位的方式到达标本；不同的环状光阑与不同放大倍数的物镜相匹配；另外有一个明视场光阑，对入射光相位不进行滤过。

相板是位于物镜内部后焦点平面上的一个圆形的薄片状结构。它的作用主要有两个，一是推迟直射光或衍射光的相位，二是吸收部分直射光。相板之所以能够发挥这两方面的作用，原因是其表面镀有两种不同的金属膜，即吸收膜和相位膜。吸收膜常为铬、银等金属在真空中蒸发而镀成的薄膜，能将通过的光线吸收掉一部分（60%~93%）；相位膜为氟化镁等在真空中蒸发镀成，能将通过的光线相位推迟 $1/4$ 波长。

相板上有两个区域，一个是对应于环状光阑环型开孔的环形区域，称为“共轭面”（在合轴调节望远镜中观察时呈暗环），通过直射光线；另一个是共轭面以外的区域，称之为“补偿面”，通过衍射光。

吸收膜和相位膜在相板上有两种不同的镀法，形成两种不同形式的相差显微镜。在一种镀法中，吸收膜和相位膜都镀在共轭面上；在另一种镀法中，吸收膜镀在共轭面，而相位膜镀在补偿面上。前一种镀法的相板能够将通过的直射光吸收掉一部分而导致振幅减弱（变暗），同时将直射光的相位推迟 $1/4$ 波长，与通过物体时相位也被推迟 $1/4$ 波长的衍射光维持在同一个相位上，两波相加，合成光亮度比背景直射光强，被检物体比背景明亮，这样的效果叫负相差；后一种镀法的相板同样可以吸收直射光，但却将衍射光的相位推迟 $1/4$ 波长，使衍射光的相位比直射光相位的落后 $1/2$ 波长，两波相减，合成光亮度比背景直射光弱，被检物体比背景暗，这种效果叫正相差。

带有相板的物镜叫相差物镜，负相差物镜（negative contrast）用缩写字母“N”表示，正相差物镜（positive contrast）用缩写字母“P”表示。根据吸收膜吸光率不同，可分为高、中、低及低低，如 Olympus 生产的物镜光透过率分为：7%、15%、20%、

40%四个等级，因此分为高（high，略写为 H）、中（medium，略写为 M）、低（low，略写为 L）及低低（low-low，略写成 LL）四类，构成了负高（NH）、负中（NM）、正低（PL）和正低低（PLL）四种类型相差物镜，这些字母符号都写在相差物镜的外壳上。根据被检物体的特性来选择使用不同类型的相差物镜。

合轴调节望远镜是一个外壳上标有“CT”符号的独立装置，替换一个目镜后用于调节通过环状光阑的环形通光孔与相板共轭面同轴。

除这三个主要特殊配件外，一般还配置绿色滤光片，主要作用是缩小照明光线波长范围，使之与相差物镜最佳波长范围（510~630 nm）接近，减小照明光线的波长不同引起的相位变化；另外，绿色滤光片还可吸收一些热量，减少长时间观察温度升高对标本的影响。Olympus 厂家生产的相差显微镜在镜检时要使用该厂规定的 IF550 绿色滤光片作为配套器件。

相差显微镜的成像原理：光源通过环状光阑的透明环，经聚光器后聚成光束，这束光线通过被检物体时，因各部分的光程不同，光线发生不同程度的衍射；通过透明圆环（亮环）且未发生偏斜的直射光经反射到达物镜后焦点平面相板上的共轭面（暗环），而发生偏斜的衍射光则无法反射到共轭面，只能经补偿面通过；两组光线再经后透镜的会聚，在同一光路上行进，而使直射光和衍射光产生光的干涉，变相位差为振幅差（图 1-1）。

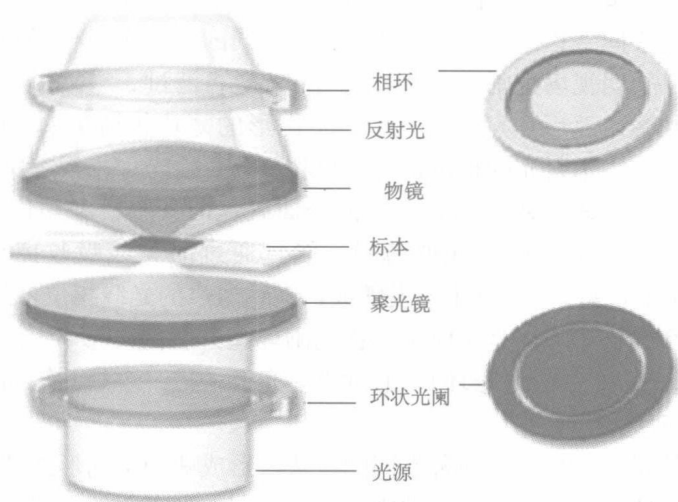


图 1-1 相差显微镜的光路图

1.2 相差显微镜的使用方法

- 1) 将标本片放到载物台上。
- 2) 在明视野（光阑标识为“0”）下先在低倍镜处对光和调焦，然后转到所需倍数并调好焦距。
- 3) 转动转盘聚光器使环状光阑与物镜放大倍数配套。即若用 40 倍物镜，也应该将