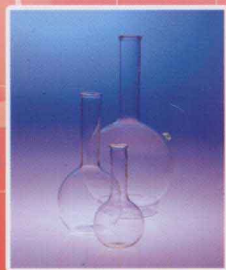
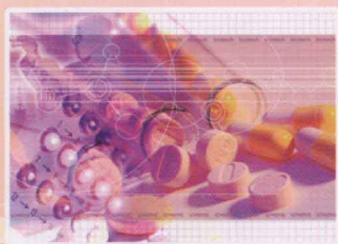


DNA

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学实验指导 及复习思考题

主 编 罗深秋

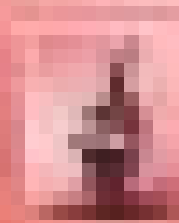
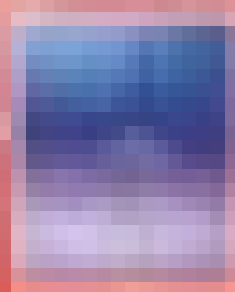
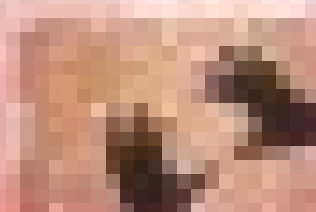
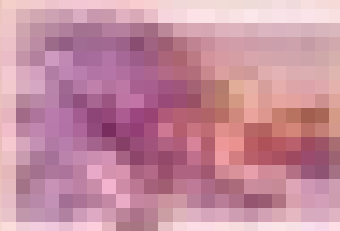


科学出版社

全国高等院校医学实验指导书系列教材

医学细胞生物学实验指导 及复习思考题

主 编 王 明



第 一 版

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学实验指导 及复习思考题

主 编 罗深秋

副主编 刘建中

编 者 (以姓氏笔画为序)

王金志

邓 宁

朱志强

任立成

刘长青

刘建中

张咏莉

张锦宏

周汝滨

赵 娟

柯志勇

高殿帅

唐 亮

鲍明升

廖亚平

熊 晔

编写秘书 王 宏

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书主要包括三部分内容,第一部分介绍了医学细胞生物学常见的 21 种实验方法,具体内容包括普通光学显微镜的操作,细胞的基本形态观察,细胞中组分的分离,DNA、RNA、糖类、脂类、细胞骨架等的显示及观察方法,细胞有丝分裂、无丝分裂的观察,染色体制备,细胞超微结构及细胞吞噬、细胞通透性、细胞周期同步化等细胞生理活动观察方法。第二部分主要是根据理论教材的章节排序,编写了部分复习思考题。第三部分以彩图的形式将书中大部分图汇集。

本书适合医学本科生、专科生使用,也可供相关的研究生实验参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验指导及复习思考题 / 罗深秋主编. —北京:科学出版社,2012.6

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-034304-8

I. 医… II. 罗… III. 医学-细胞生物学-实验-高等学校-教学参考资料

IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 094529 号

责任编辑:朱 华 秦致中 / 责任校对:张怡君

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 9 月第三次印刷 印张:6 1/2 插页:4

字数:149 000

定价:24.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

在2010年编写理论教材《医学细胞生物学》的时候,大家就开始考虑编写一本相应的实验指导,现在这件事总算完成了。

本书的编写,虽然仍有教学系列的老师参加,但这次筛选了不少具有丰富经验的实验系列的老师承担编写任务,主要目的是期待本书的应用更具实用价值。

本书初稿完成后,除主、副主编外,还邀请了邓宁、张咏莉、王宏、张锦宏、柯志勇老师等一起审阅、讨论了编写内容,统一了编写风格及希望作者修改的问题。文稿最后由本人进行了润色。

本书由21个实验项目组成,均为较常用的细胞生物学领域的实验,但限于学时,在本、专科教学中可能不一定全部实施,各使用单位在实际应用中根据自己的具体情况选择确定。

十分感谢为本书提供照片的同行,其中电镜照片大部分来自我的恩师,日本京都大学小川和朗教授的著作,学术传承再一次引起我对这位学识渊博、对中国人民充满友好情谊的学者深深缅怀之意。

为了提高图片清晰度,方便学生确认试验结果的可靠性,我们将大部分彩图集中起来进行彩色印刷。

参加理论教材编写的老师,当时都想在每章的后面附上复习思考题,但因篇幅限制未果。现经主编统一整理后的复习思考题附在本书中,相信会给学生们的复习带来不少的方便。

限于水平,对本书存在的各种问题,希望使用者指教,以便再版时更加完善。

罗深秋

2012年3月12日于广州

目 录

前言

第一部分 医学细胞生物学实验	(1)
实验一 普通光学显微镜的结构和使用	(1)
实验二 细胞基本形态和结构	(5)
实验三 共聚焦激光显微镜的原理和应用	(10)
实验四 细胞组分的分离技术	(15)
实验五 细胞中 DNA、RNA 的染色观察	(19)
实验六 线粒体的制备与观察	(22)
实验七 小鼠成纤维细胞的原代培养	(26)
实验八 细胞计数	(33)
实验九 细胞中糖和脂的显示	(35)
实验十 聚乙二醇(PEG)介导的细胞融合	(38)
实验十一 细胞活体染色和观察	(41)
实验十二 细胞膜通透性	(44)
实验十三 细胞吞噬	(46)
实验十四 细胞骨架制备与观察	(48)
实验十五 免疫荧光抗体法检测细胞骨架	(51)
实验十六 吖啶橙染色检测细胞凋亡	(53)
实验十七 细胞超微结构	(55)
实验十八 细胞的无丝分裂与有丝分裂	(63)
实验十九 减数分裂	(66)
实验二十 染色体的制备和核型分析	(70)
实验二十一 细胞周期同步化	(81)
第二部分 复习思考题及参考答案	(85)

彩图

第一部分 医学细胞生物学实验

实验一 普通光学显微镜的结构和使用

【实验目的】

- (1) 了解普通光学显微镜的构造及成像原理。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜的正确使用方法。

【实验原理】

普通光学显微镜主要由物镜和目镜组成,均为凸透镜。物镜的焦距(f_1)短,目镜的焦距(f_2)长。物镜到标本(BA)的距离稍大于物镜(Lo)的焦距,标本经物镜放大后,形成放大倒立的实像 $A'B'$,实像 $A'B'$ 是目镜的物体,它位于目镜的焦点以内,所以 $A'B'$ 经目镜(Le)再次放大后,形成放大的虚像 $A''B''$ (图 1-1)。

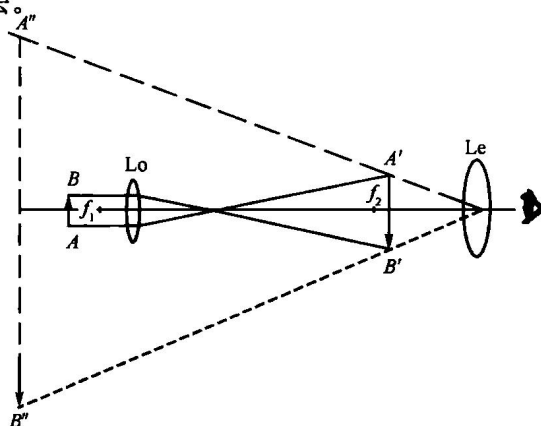


图 1-1 普通光学显微镜成像原理图

【实验物品】

1. 材料与标本 字片、红绿羊毛交叉片、人血涂片。
2. 器材 显微镜、擦镜纸。
3. 试剂 香柏油、二甲苯(或乙醚-乙醇混合液,比例为 2 : 3)。

【实验步骤】

(一) 显微镜的结构

普通光学显微镜由机械部分、照明部分和光学部分组成(图 1-2)。

1. 机械部分 显微镜的机械部分包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗调手轮、微调手轮等部件。

(1) 镜座:镜座是显微镜的基本支架,它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒,它是用来安装光学放大系统部件的基础。底座和镜臂起稳定和支撑整个显微镜的作用。

(2) 镜筒:镜筒上接目镜,下接转换器,形成接目镜与接物镜(装在转换器下)间的暗室。从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因

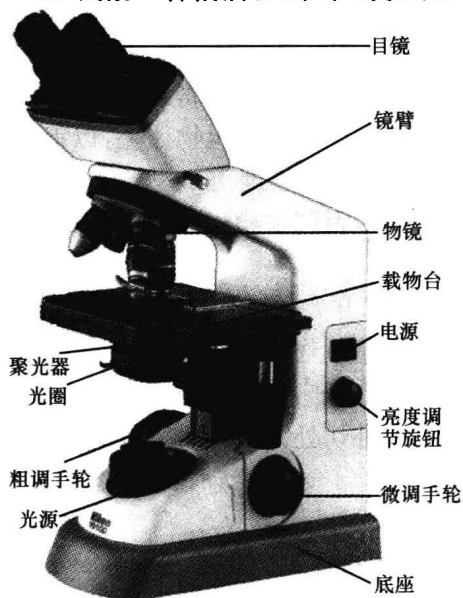


图 1-2 普通光学显微镜

为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化,不仅放大倍率随之变化,而且成像质量也受到影响。因此,使用显微镜时,不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160 mm,此数字通常标在物镜的外壳上。镜筒有单筒式、双筒式两种,单筒式镜筒又分直立和倾斜式,而双筒式镜筒均为倾斜式。

(3) 物镜转换器:物镜转换器上可安装 3~4 个接物镜,一般是 3 个接物镜(低倍、高倍、油镜)。转动转换器,可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通,与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

(4) 载物台:载物台中央有一孔,为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推动器,其作用为固定或移动标本的位置,使得镜检对象恰好位于视野中心。

(5) 推动器:是移动标本的机械装置,它是由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成的,好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺,构成很精密的平面坐标系。如果我们须重复观察已检查标本的某一部分,在第一次检查时,可记下纵横标尺的数值,以后按数值移动推动器,就可以找到原来标本的位置。

(6) 粗调手轮(粗螺旋):粗调手轮是移动镜筒调节接物镜和标本间距离的机件,老式显微镜粗调手轮向前扭,镜头下降接近标本。新近出产的显微镜镜检时,右手向前扭载物台上升,让标本接近物镜,反之则下降,标本脱离物镜。

(7) 微调手轮(细螺旋):用粗调手轮只可以粗放的调节焦距,要得到最清晰的物像,需要用微动螺旋做进一步调节。微调手轮每转一圈镜筒移动 0.1 mm(100 μm)。新近出产的较高档次的显微镜的粗调手轮和微调手轮是共轴的。

2. 照明部分 安装在载物台的下方,由反光镜(光源)、聚光器和光圈组成。

(1) 反光镜:较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体,在镜座上装有反光镜。反光镜是由一平面和另一凹面的镜子组成,可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透镜的中央,照明标本。不用聚光器时用凹面镜,凹面镜能起会聚光线的作用。用聚光器时,一般都用平面镜。电光源普通光学显微镜没有反光镜,而在显微镜镜座上装有光源,并有电流调节螺旋,可通过调节电流大小调节光照强度。

(2) 聚光器:聚光器在载物台下面,它是由一组聚光透镜和升降螺旋组成的。聚光器安装在载物台下,其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上,以得到最强的照明,使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节,使焦点落在被检物体上,以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25 mm 处,而其上升限度为载物台平面下方 0.1 mm。因此,要求使用的载玻片厚度应在 0.8~1.2 mm,否则被检样品不在焦点上,影响镜检效果。

(3) 光圈:聚光器前透镜组前面还装有虹彩光圈,它可以开大和缩小,控制通过的光量,从而影响着成像的分辨力和反差,若将虹彩光圈开放过大,超过物镜的数值孔径时,便产生光斑;若收缩虹彩光圈过小,分辨力下降,反差增大。因此,在观察时,通过虹彩光圈的调节再把视场光阑(带有视场光阑的显微镜)开启到视场周缘的外切处,使不在视场内的物体得不到任何光线的照明,以避免散射光的干扰。

3. 光学部分

(1) 目镜:安装在镜筒上端,为双筒目镜,通常用 10 $\times$ 的目镜。

(2) 物镜:安装在镜筒前端转换器上的接物透镜利用光线使被检物体第一次造像,物镜成像的质量,对分辨力有着决定性的影响。一般有 3~4 个物镜(图 1-3),通常在物镜上标

有主要性能指标——放大倍数和镜口率,如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.30。

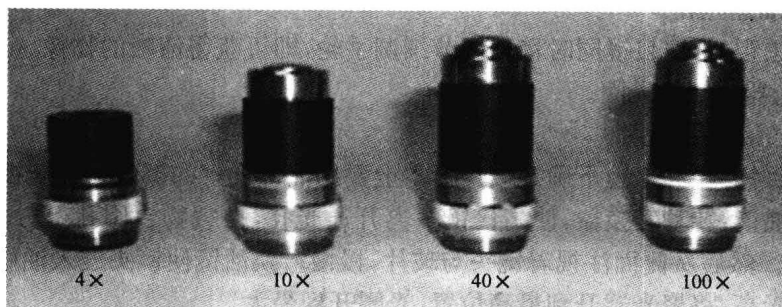


图 1-3 普通光学显微镜物镜镜头

物镜的种类很多,可从不同角度来分类:根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同,可分为:①干燥系物镜:以空气为介质,如常用的 40× 以下的物镜,数值孔径均小于 1。②油浸系物镜:常以香柏油为介质,此物镜又叫油镜头,其放大率为 90×~100×,数值孔值大于 1。

数值孔径(numerical aperture, N. A.),也叫做镜口率(或开口率)。在物镜和聚光器上都标有它们的数值孔径,数值孔径是物镜和聚光器的主要参数,也是判断它们性能的最重要指标。物镜的性能取决于物镜的数值孔径,数值孔径越大,物镜的性能越好。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系,它反映该物镜分辨力的大小,数值越大,其分辨力越高。分辨力是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力,这个可分辨的最小间隔距离越近,分辨力越高。人的分辨力可达 0.1 mm,显微镜的分辨力能达到 0.2 μm。

$$R = 0.61\lambda / \text{N. A.} \quad \text{N. A.} = n \cdot \sin(\alpha/2)$$

R 为分辨力, λ 为光波波长, N. A. 为镜口率, n 为介质折射率, α 为透镜锥顶角,折射率大的介质(如香柏油的折射率为 1.515,空气的折射率为 1),其分辨力也大。

工作距离指物像调节清楚时物镜下表面与盖玻片上表面之间的距离;物镜的放大倍数越大,工作距离越小。

(二) 普通光学显微镜的使用方法

1. 低倍镜(10×)的使用

(1) 将显微镜放在离实验台边缘 10 cm 处(至少约一拳的距离)。

(2) 打开显微镜的电源开关,然后使低倍镜对准镜台,开大光圈,上升聚光器并调节光亮调节旋钮至视野内光线明亮亮度适中。

(3) 放置标本片:取一张载有标本的载玻片(以下简称玻片标本),先用肉眼观察,以确定正反面(载有标本的面为正面,一般都贴有标签)和标本的大致位置。再将玻片标本正面朝上放置在载物台并用弹簧夹夹好,用推进器将玻片标本的标本移到载物台圆孔,聚光镜的正方。

(4) 调节焦距:从显微镜侧面注视物镜镜头,同时转动粗调手轮,使得载物台上升到最高(物镜头与标本片的距离约 5 mm 处),然后一边在目镜上观察,一边缓慢转动粗调手轮,使载物台缓慢下降至视野中出现清晰的物像。

如经过上述步骤还无法看清楚图像,应报告带教老师求得帮助,也可以重复操作一次。

2. 高倍镜(40×)的使用

(1) 选好目标:一定先在低倍镜下把待观察部位移动到视野中心,将物像调节清晰。

(2) 转换高倍镜物镜:为防止镜头碰撞玻片,从显微镜侧面注视着,慢慢地转动转换器使高倍镜头对准通光孔。

(3) 调节焦距:观察目镜同时稍稍调节细调手轮,即可获得清晰的物像。若视野亮度不够,可上升聚光器和开大光圈。

3. 油镜(100×)的使用

(1) 选好目标:在高倍镜下确定玻片标本上要用油镜观察的部位并移至视野的正中央。

(2) 转换油镜:转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,在载物台圆孔上方的玻片标本处滴一滴香柏油。然后从侧面注视着镜头与玻片,慢慢转换油镜使镜头浸入油中。

(3) 调节光亮:将聚光器升到最高位置,光圈开到最大。

(4) 调焦:观察目镜同时调节细调手轮,使得物像清晰。

若目标不理想或不出现物像需重找,在加油区之外重找应按:低倍→高倍油镜程序。在加油区内重找应按:低倍→油镜程序,以免油沾污高倍镜头。

(5) 擦拭油镜头:观察完毕,先用干的擦镜纸吸掉粘在油镜头上的油,再用擦镜纸条沾少许二甲苯(或乙醚-乙醇混合液,比例为2:3)擦拭镜头及周围,最后用干的擦镜纸擦干多余的二甲苯。

(6) 玻片标本上的油处理方法同上,只是因为玻片上的油较多,要重复2~3次才能擦干净。

【实验结果和记录】

1. 低倍镜的练习 比较肉眼直接观察字片与低倍镜下观察物像的有什么区别?左右前后移动玻片与低倍镜下观察到的物像有什么区别?

2. 高倍镜的练习 取红绿羊毛交叉片,先在低倍镜下找到羊毛,并将红绿羊毛的交叉点移到视野的中心,再换高倍镜观察,能否在交叉点同时看到两根羊毛(利用细螺旋进行判断)。

3. 油镜的练习 取人血涂片,先用低倍镜、高倍镜观察,再换油镜观察。比较三种放大倍数的物镜的分辨力并练习擦拭油镜头和标本片。

【注意事项】

(1) 显微镜的光学部分不能用手直接摸擦。

(2) 不可随意拆卸显微镜的零部件。

(3) 需要更换标本片时,将物镜头转离载物台,方可取下或放置标本片。

(4) 转换物镜时应转动物镜上方的旋转器,切忌手持物镜转换。

(5) 要是长时间不用显微镜时,请将显微镜电光源的亮度调到最暗(维持灯的寿命)。

(6) 显微镜使用完毕后,必须复原,其具体步骤是:先转动转换器使物镜头离开通光孔,再取下标本片,下降载物台,下降聚光器、关闭光圈,玻片移动器回位,将显微镜电光源的亮度调到最暗,再关闭电源,盖上绸布和外罩,最后将显微镜放在桌子的中央。

(柯志勇)

实验二 细胞基本形态和结构

【实验目的】

- (1) 熟悉人体及动植物细胞的基本形态和结构。
- (2) 初步掌握临时玻片标本的制备方法。
- (3) 初步学习捣毁脊髓法处死青蛙或蟾蜍的操作方法。
- (4) 初步掌握光学显微镜下所见细胞、组织结构的绘图记录方法。
- (5) 进一步掌握光学显微镜的规范使用方法。

【实验原理】

细胞是生命活动的基本结构单位 and 功能单位。构成人体和其他高等动植物的细胞种类繁多,形态各异。有球形、椭圆形、扁平形、立方形、长梭形、星形等。细胞的形态结构与功能相关是很多细胞的共同特点,在分化程度较高的细胞更为明显,这种合理性是生物漫长进化过程所形成的。例如:具有收缩功能的肌细胞呈长梭形或条形;具有感受刺激和传导冲动机能的神经细胞有长短不一的树枝状突起;游离的血细胞为圆形、椭圆形或圆饼形。

高等生物体不同细胞的大小差异很大,其直径大多数在 $10\sim 100\ \mu\text{m}$,一般都需要借助显微镜才能看到。由于细胞较小,而且其内含有较大比例的水分,故大多是无色透明的,如果不经染色处理,在显微镜下难以看清细胞的结构。因此,要观察某种细胞时,通常先进行染色处理。

虽然细胞的形态、大小和功能各不相同,但在普通光学显微镜下,一般可见人体及动物细胞的基本结构可分为细胞膜(cell membrane)、细胞质(cytoplasm)和细胞核(nucleus)三个部分。但也有例外。例如:哺乳类红细胞成熟时细胞核消失。植物细胞的基本结构可分为细胞壁(cell wall)、细胞膜、细胞质和细胞核四个部分。

【实验物品】

1. 材料和标本 青蛙或蟾蜍、洋葱、人口腔黏膜上皮细胞、人血涂片。
2. 器材和仪器 显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、吸水纸、手术器材一套、解剖盘一个、小平皿两个、消毒牙签。
3. 试剂 1%甲苯胺蓝溶液、1%碘液、1%甲基蓝溶液、瑞氏染液、Ringers 液(两栖类用)。

【实验步骤】

1. 洋葱鳞茎表皮细胞的标本制备 取干净载玻片,中央滴 1 滴 1%碘液;取洋葱鳞茎,用镊子在其内表面轻轻撕取一小块方形膜质表皮(边长 $3\sim 4\ \text{mm}$),置于载玻片的碘液滴中,铺平。用镊子夹取干净的盖玻片,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。

2. 人口腔黏膜上皮细胞的标本制备 取干净载玻片,中央滴 1 滴 1%碘液;用一根灭菌的牙签轻轻刮取颊部任何一侧的上皮(上、下唇内侧亦可)。然后将它涂在载玻片上的碘液中,并搅动几下使细胞散开。用镊子夹取干净的盖玻片,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。

3. 人血涂片标本的制备

(1) 消毒和取血:先按摩取血部位,使血流通畅;再用 75%乙醇溶液消毒采血针和取血部位(如指尖)。待 75%乙醇溶液干后,刺破皮肤,使血自然流出,勿挤。取干净载玻片,让血滴在载玻片一端,注意手指持握载玻片的边缘,勿触及其表面。不能使载玻片接触取血部位的皮肤。

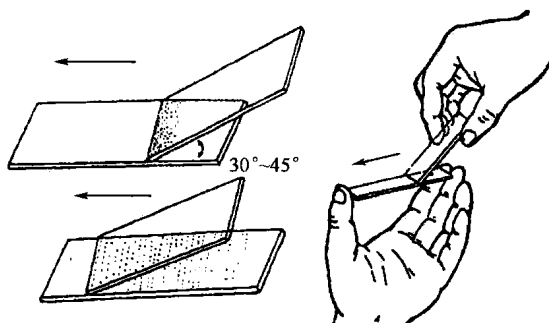


图 2-1 血涂片的制备方法

(2) 推片:取一块边缘光滑的载玻片做推片。将其一端置于血滴前方,向后移动到接触血滴,使血液均匀分散在推片与载片的接触处。然后使推片与载片呈 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 角,向另一端平稳地推出,使血液在载玻片上形成一层薄而均匀的血膜。如图 2-1 所示。通常推片与玻片间的角度愈大,血膜愈厚;斜角愈小,速度愈快,则涂片愈薄。血滴的大小对血膜厚薄也有影响,血滴越大,则血膜越厚。推片时速度要一

致,否则血膜呈波浪形,厚薄不匀。涂片推好后,迅速在空气中晃动,使之自然干燥。

(3) 染色:在玻片上血膜薄而均匀的区域滴上几滴瑞氏染液(或先用玻璃蜡笔在血膜较薄区画一圆圈,再往圈中滴加染液,这样可防染液向四周扩散)。染色 1 min 后往染液中加入等量的蒸馏水稀释染液,继续染 2~3 min。此时液面上可浮现一层金黄色金属样的物质。用自来水轻轻冲洗玻片,晾干后即可观察。

4. 青蛙或蟾蜍血涂片的制备 取青蛙或蟾蜍一只,捣毁脑和脊髓。剖开胸腔,剪开心脏,取一小滴血液于载玻片的一端推片。推片和染色方法如前所述。

5. 制备青蛙或蟾蜍脊髓压片观察脊髓前角运动神经细胞 在青蛙或蟾蜍口裂处剪去头部,除去延脑,剪开椎管,可见乳白色脊髓,取下脊髓放在平皿内,用 Ringers 液洗去血液后放在载玻片上,剪碎。将另一载玻片压在脊髓碎块上,用力挤压。将上面的载玻片取下即可得到压片。在压片上滴一滴甲苯胺蓝染液,染色 10 min,盖上盖片,吸去多余染液。

6. 青蛙或蟾蜍骨骼肌细胞的剥离 剥去青蛙或蟾蜍腿部皮肤,取一小块肌肉束(约 0.3 cm),用 Ringers 液洗去血液,放在载玻片上,用镊子和解剖针剥离肌肉块成为肌束,继续剥离,获得头发丝般粗细的肌纤维(肌细胞)。滴一滴 Ringers 液并尽可能拉直肌纤维。盖上盖玻片,即可观察。

7. 青蛙或蟾蜍肝脏压片的制备 剪开蟾蜍腹腔,取一小块(约 $2\sim 3\text{ mm}^3$)肝放在平皿内,用 Ringers 液洗净,用镊子轻压将肝中的血挤出。然后放在载片上,制片方法同脊髓压片。染色用甲基蓝。

【实验结果和记录】

1. 洋葱鳞茎表皮细胞标本的观察 将制备好的临时制片置低倍镜下观察,可见洋葱鳞茎表皮是由许多长柱状、排列整齐且紧密的细胞组成(图 2-2,彩图 2-1)。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一下结构(图 2-3,彩图 2-2):

(1) 细胞壁: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。细胞膜(质膜)位于细胞壁内侧并与其紧密相贴,光镜下不易分辨。

(2) 细胞核:位于细胞中央或靠近细胞边缘,呈圆形或卵圆形,染成深黄色。转动细调螺旋,在细胞核内可以看到1~2个折光较强的核仁。

(3) 细胞质:细胞膜与细胞核之间的区域是细胞质,染成浅黄色。其中可以见到一至数个液泡,液泡内充满清澈明亮的液体。



图 2-2 洋葱鳞茎表皮细胞(100×)

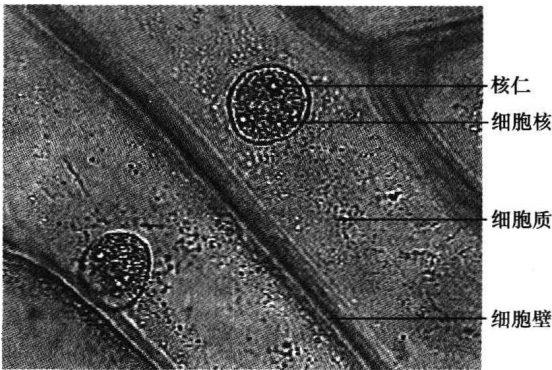


图 2-3 洋葱鳞茎表皮细胞(400×)

2. 人口腔黏膜上皮细胞标本的观察

将制备好的口腔黏膜上皮细胞玻片标本置于显微镜下观察,先用低倍镜观察,可见呈不规则形、或扁平椭圆形、或多边形的细胞,单个或多个连在一起。这就是口腔黏膜上皮细胞。选择轮廓清晰而无重叠的细胞,移至视野中央,转换高倍镜观察。高倍镜下,可清晰地看到细胞外形扁平而不太规则,中央有一卵圆形的被染成深黄色的细胞核,细胞质染成浅黄色,均匀地分布于细胞核与细胞膜之间(图 2-4,彩图 2-3)。

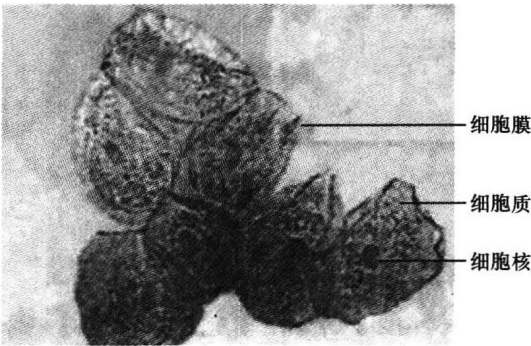


图 2-4 人口腔黏膜上皮细胞(400×)

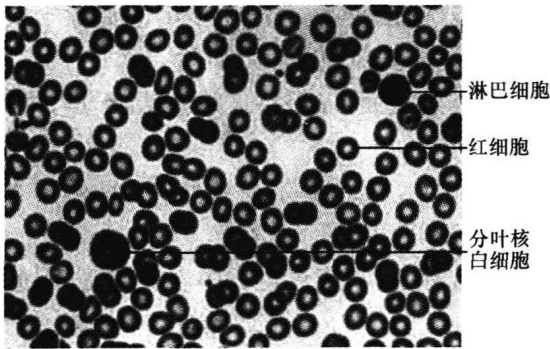


图 2-5 人血细胞(400×)

3. 人血涂片标本的观察 将已染好色的血涂片标本放置于显微镜下,先用低倍镜浏览整张血涂片,选择细胞均匀分布、较少重叠、有核细胞较多的区域。然后转换高倍镜仔细观察红细胞和白细胞。

在人血涂片上红细胞数目最多、体积小、呈双凹圆盘状,无细胞核(图 2-5,彩图 2-4),细胞质呈粉红色;白细胞比例较小,寻找较困难些,但细胞体积较大,细胞核明显,形态多样,呈紫蓝色。

4. 青蛙或蟾蜍血涂片的观察 显微镜观察可见青蛙或蟾蜍红细胞为椭圆形,细胞质浅红色,细胞核呈椭圆形(图 2-6,彩图 2-5)。白细胞数目少,为圆形。

5. 青蛙或蟾蜍脊髓压片观察脊髓前角运动神经细胞 在显微镜下观察,染色较深的小

细胞是神经胶质细胞。染成蓝紫色的、大的、有多个突起的细胞是脊髓前角运动神经细胞,胞体呈三角形或星形,中央有一个圆形细胞核,内有一个核仁(图 2-7,图 2-8,彩图 2-6,彩图 2-7)。

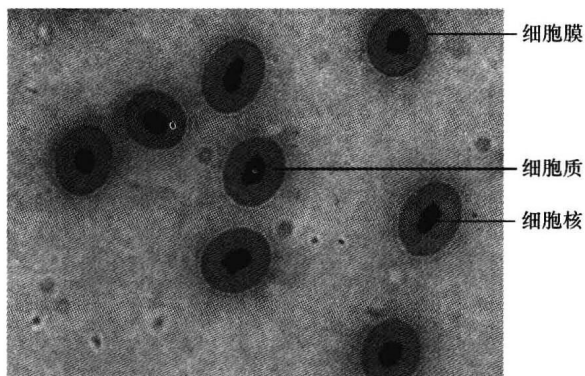


图 2-6 蟾蜍红细胞(400×)

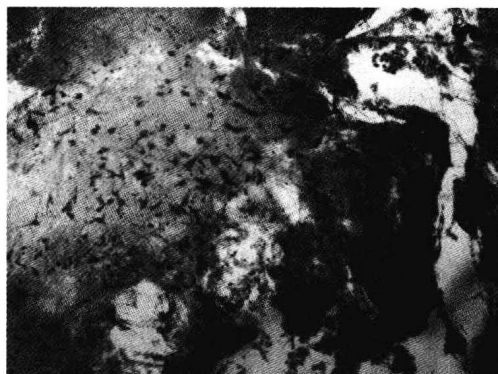


图 2-7 青蛙脊髓压片(100×)

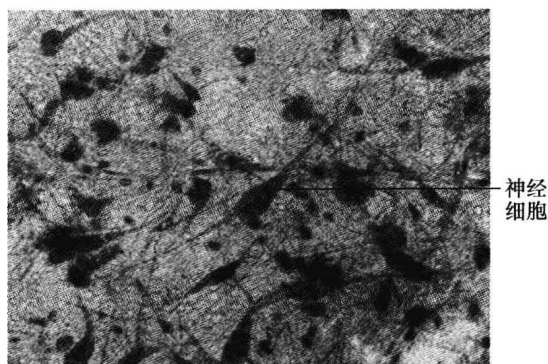


图 2-8 青蛙脊髓压片(400×)

6. 青蛙或蟾蜍骨骼肌细胞的观察 在低镜下,肌细胞为圆柱形,每个细胞有多个细胞核。转换高倍镜,可见折光不同的横纹,每个肌细胞有多个核,分布于细胞的周边。

7. 青蛙或蟾蜍肝脏压片的制备与观察 显微镜下观察可见肝细胞核染成蓝色,肝细胞紧密排列,挤成多角形。

【注意事项】

制备临时玻片标本,特别是血涂片标本,应注意以下问题:

(1) 玻片的清洗:新玻片常有游离碱质,因此应用清洗液或 10% 盐酸浸泡 24 h,然后再彻底清洗。用过的玻片可放入适量肥皂水或合成洗涤剂的水中煮沸 20 min,再用热水将肥皂和血膜洗去,用自来水反复冲洗,必要时再置 95% 乙醇溶液中浸泡 1 h,然后擦干或烤干备用。

(2) 使用玻片时只能手持玻片边缘,切勿触及玻片表面,以保持玻片清洁,干燥,中性、无油腻。

(3) 一张良好的血涂片,要求厚薄适宜,头体尾分明,分布均匀,边缘整齐,两侧留有空隙。血涂片制好后最好立即固定染色,以免细胞溶解和发生退行性改变。

(4) 血涂片的血膜未干透,细胞尚未牢固附在玻片上,在染色过程中容易脱落,因此血膜必须充分干燥。

【作业】

(1) 按生物绘图的要求,绘制洋葱鳞茎表皮细胞图、人口腔黏膜上皮细胞图,并注明细胞各部分结构的名称。

(2) 按生物绘图的要求,绘制蟾蜍红细胞图、人的红细胞和白细胞图,并注明细胞各部分结构的名称。

(3) 请举例说明细胞形态与功能的关系。

附:生物绘图的要求和方法

生物绘图是形象描述生物外部形态和内部结构的一种重要的科学记录方法,它不同于一般的绘画,要求具有科学性和真实性。在科学研究中常用生物绘图法来反映生物的形态结构特征。绘图记录光学显微镜下所观察到的标本的形态结构,也是细胞生物学实验报告的一种重要形式。基本要求和方法如下:

(1) 基本工具:HB、3H 或 2H 铅笔,绘图橡皮,直尺。

(2) 生物绘图一律用铅笔,铅笔要保持尖锐。图中的各部分以点和线来表示。用线勾画物像的轮廓,线条要匀细且明确清晰。物像中的明暗(或染色深浅)部分用点的疏密表示,注意是铅笔尖垂直向下打点,用力均匀,点要圆且大小一致。不得涂阴影。

(3) 在仔细观察和正确理解的基础上,选择有代表性的、典型的、最能说明绘图目的的物像进行描绘。绘图过程中应注意各部分结构的形态、大小、比例关系和明暗(染色深浅)部分,真实、准确地描绘出相应的结构。

(4) 绘图时每幅图的大小、位置在绘图纸上必须安排得当,并注意纸面的整洁美观。因图的右侧和下方需注字,故图通常绘在纸的略偏左上方的位置处。

(5) 先用软铅笔(HB)把物像的整体和主要部分轻轻描绘在绘图纸上,下笔要轻,把草图绘制出来。对草图进行修正和补充后,再用硬铅笔(3H 或 2H)复描一次以定稿。然后根据物像各部分明暗或染色深浅的不同,以点的疏密表示出来。

(6) 标注图中的各部分结构名称时,要用直尺在图的右侧引出水平线,各引线间隔要均匀且末端要整齐在同一垂线上。用正楷字体把结构名称注于线之末端,所写之字必须横列。

(7) 在图的正下方注明图的名称及显微镜的放大倍数。

(周汝滨)

实验三 共聚焦激光显微镜的原理和应用

【实验目的】

(1) 让学生了解激光共聚焦显微镜的组成,掌握激光共聚焦显微镜常用的基本操作及注意事项。能够熟练、准确设计光路,重点掌握激光共聚焦显微镜测定细胞荧光信号动态变化的方法,了解激光共聚焦显微镜在生物学上的应用。

(2) 了解激光共聚焦显微镜的应用。

【实验原理】

激光共聚焦显微镜是将光学显微镜技术、激光扫描技术和计算机图像处理技术结合在一起的高技术设备。激光共聚焦显微镜系统主要包括扫描模块、荧光显微镜、数字信号处理器、计算机一级图像输出设备等。

通过照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的,激光光源经照明针孔,经由分光镜反射至物镜,并聚焦于样品上,对标本内焦平面上的每一点进行扫描,这样由焦平面上样品的每一点的荧光图像组成了一幅完整的共聚焦图像。然后激发出的荧光经原来入射光路直接反向回到分光镜,通过探测针孔时先聚焦,聚焦后的光被光电倍增管(PMT)探测收集,并将信号输送到计算机。在这光路中,焦平面以外区域射来的光线在检测小孔平面是离焦的,不能通过小孔,只有在焦平面上的光才能穿过探测针孔被观测到。

在共聚焦显微镜的载物台上所加装的微量步进马达,可驱动载物台在扫描过程中按照设定步距移动,以使物镜聚焦于样品的不同层面上并采集该层的荧光图像,从而得到样品按照深度排列的各个横断面的一系列荧光图像。

若按照一定的时间间隔、重复地采集样品内固定区域的荧光图像,并对其进行定位、定性及定量分析,则可实现对该样品的实时监测。

【实验物品】

1. 激光共聚焦显微镜。

2. 细胞 培养的成纤维细胞(3T3 成纤维细胞或其他贴壁细胞)。

3. 缓冲液 罗丹明(rhodamine 123, Rh 123)母液(1 mmol/L):将 0.4mg Rh123 溶解到 1 ml DMSO 中制备成 Rh123-DMSO 母液,用培养基稀释母液至 20 $\mu\text{mol/L}$ Rh123 缓冲液(工作液);10%福尔马林缓冲液;PBS 缓冲液。

4. 盖玻片 厚度应小于 0.17 mm,使用前需要用玻璃洗液浸泡处理一天以上,铬酸浸泡过夜,去离子水冲洗掉残存的洗液后,无水乙醇中浸泡待用,临用前在酒精灯上过火灭菌处理。

【实验步骤】

(一) 激光扫描共聚焦显微镜的结构特点

激光共聚焦显微镜主要由四部分组成(见图 3-1):

1. 荧光显微镜光学系统 荧光显微镜作为激光扫描共聚焦显微镜的一个重要的组成部分,其主要是用于预览样品。通常荧光显微镜部分配备两个光源—卤素灯光源和汞灯光

源。其卤素灯光源用于寻找样品焦平面、观察样品位置、形态和分布;其汞灯用于观察和分辨样品中产生荧光物质的成分和位置。对于光敏(例如猝灭)的样品最好用其光镜进行预览,以减少对样品的刺激。

2. 扫描装置 有可动反光镜、分光器、pinhole 及检测器等重要部件。检测器采用高灵敏度的光电倍增管(photo multiplier tube; PMT),其检测的范围和灵敏度可根据样品的强度进行连续调节。将荧光图像的强度按照 0~255 分级显示。

3. 激光光源 常用的激光谱线可以覆盖很多生物用荧光探针和用于日常荧光分析。目前通常采用的激光谱线有:Ar-458nm、476nm、488nm、514nm; Kr-568nm、647nm; He: Ne-543nm、633nm; Ar(UV)-351nm、364nm 为紫外光;蓝紫光半导体激光器发出 405nm 的激光。

4. 检测系统 整套仪器由计算机控制,各部件之间的操作切换都可在计算机操作平台界面中方便灵活运行。由于激光器在工作时散发大量的热,需要风扇降温,突然断电可能烧坏激光器,因此还需要配备稳压电源和不间断供电装备。

(二) 共聚焦激光扫描显微镜的应用

LSCM 检测内容和应用范围非常广泛,以下仅简单介绍 LSCM 常用的检测内容及其荧光探针。

1. 细胞内游离钙 激光共聚焦扫描显微镜常用的有 Fluo-3、Rhod-1、Indo-1、Fura-2 等,前两者为单波长激光探针,利用其单波长激发特点可直接测量细胞内 Ca^{2+} 动态变化,为钙定性探针;后两者为双波长激发探针,利用其双波长激发特点和比率技术,能定量细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$,为钙定量探针。

2. DNA 和 RNA 核酸的荧光探针 用于共聚焦激光扫描显微镜的主要有吖啶橙(acridine orange, AO)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)。两种染料既可标记 DNA 又可标记 RNA,如为获得单独的 DNA 或 RNA 分布,染色前可用 RNA 酶或 DNA 酶处理细胞。PI 不能进入完整的细胞膜,故不能标记活细胞内的 DNA 和 RNA。

3. 膜电位 激光共聚焦扫描显微镜可利用荧光探针在细胞膜内外分布的差异测出膜电位,可以观察细胞膜电位的变化结果,还可用于连续监测膜电位的迅速变化。膜电位荧光探针根据其其对膜电位变化反应速度分为快、慢两类探针。DiBAC4(3)为最常用的膜电位荧光探针,为带负电荷的阴离子慢反应染料。该探针本身无荧光,当进入细胞与胞质内的蛋白质结合后才发出荧光,测量时要求细胞浸在荧光染料中。当细胞内荧光强度增加即膜电位增加示细胞去极化;反之,细胞内荧光强度降低即膜电位降低示细胞超极化。Rhodamine 123 主要用于线粒体膜电位测量,是一种亲脂性阳离子荧光探针,当线粒体膜内侧负电荷增多时,荧光强度增加。

4. pH 正常细胞胞质内的 pH 一般在 6.8~7.4 的范围,而某些细胞器如溶酶体的 pH

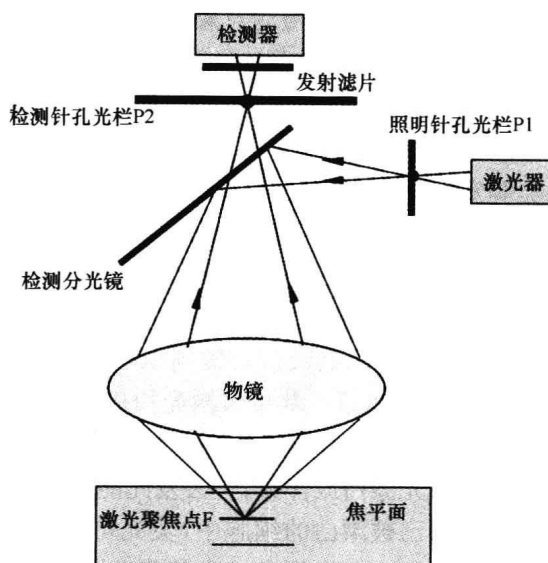


图 3-1 激光扫描共聚焦显微镜工作原理示意图