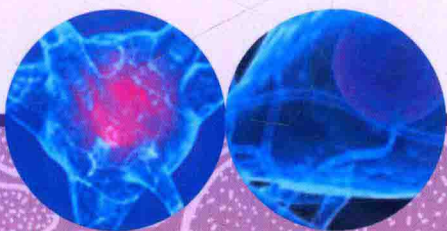


细胞生物学 实验指导



熊 勇 杨青松 屈 睿 / 主编



科学出版社

细胞生物学实验指导

熊 勇 杨青松 屈 睿 主 编

科学出版社
北 京

内 容 简 介

《细胞生物学实验指导》是为生物技术、生物科学、生物学等专业开设的一门专业实验课程。细胞生物学是在显微、亚显微和分子水平三个层次上,研究细胞的结构、功能和各种生命规律的一门科学。在我国基础学科发展规划中,细胞生物学与分子生物学、神经生物学和生态学并列为生命科学的四大基础学科。《细胞生物学实验》是生物类相关专业必修的课程,《细胞生物学实验指导》的主要内容包括:①实验设备及安全了解;②细胞形态观察、数量统计;③死活细胞鉴定;④细胞器观察及制备;⑤染色体分裂、染色体分带制备等;⑥细胞化学成分显色;⑦细胞器制备和观察;⑧常用生化、细胞试剂的制备。实验材料大部分结合学校的实际情况,就地取材,方便教学和节约成本,实验安排有预习报告、实验报告和实验注意事项,并在大部分实验中设有实验重点和实验难点,利于教学安排。

本书可作为生物技术专业和相关生物专业实验教材,还可以作为其他本科、专科学生的实验入门指导书和参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验指导/熊勇,杨青松,屈睿主编. —北京:科学出版社, 2017.3

ISBN 978-7-03-052106-4

I. ①细… II. ①熊… ②杨… ③屈… 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(2017)第050438号

责任编辑:张展 郑述方/责任校对:韩雨舟

责任印制:罗科/封面设计:墨创文化

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>

成都锦瑞印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年3月第一版 开本:A5 890×1240

2017年3月第一次印刷 印张:3.75

字数:130千字

定价:22.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

《细胞生物学》实验课的目的，主要在于进行细胞生物学基本技能的训练，验证部分基本原理，培养科学思维方法、学习作风以及独立分析问题和解决问题的能力。细胞生物学是从显微水平、亚显微水平和分子水平三个层次研究细胞结构、功能、代谢等的一门学科，也是生物技术本科专业一门重要的基础课程。

《细胞生物学实验指导（讲义版）》已经使用多年，2006～2015年作为生物技术专业细胞生物学实验的教材，该讲义经过多次修改，目前还在不断地完善中。本书经申报云南民族大学化学与生物技术学院特区的教材项目建设，学院同意出版。在学院特区项目经费的资助下，在全体编者的共同努力下，完成了本书的编著，希望能借此提高学生的实验课质量，有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

本书根据我院学生的实际情况和理科院校对本科生的实践教学要求，从实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、实验结果、实验预习、实验报告、实验注意事项等多方面进行编排，较为系统地介绍细胞生物学的实验内容和基本实验技术。

本书内容分为基础实验和综合实验两部分，重点突出，详细编写验证性实验、综合性实验，力求实用、简明、清晰。大部分实验都设了重点和难点，便于学生在有限的时间内抓住重点和难

点,加深对理论知识的理解,掌握相应的基本技能,培养和训练其动手能力、观察能力,在实验的过程中,能够独立完成实验操作的要求,通过学习《细胞生物学实验指导》课程达到综合素质的提高。

本书适合生物技术专业 and 相应生物学类专业实验教学使用。细胞生物学实验指导(讲义版)是邓芳轶和其他任课老师多年教学实践的累积,在此特别感谢邓芳轶老师的辛苦付出。

由于编者水平有限,以及编写时间较仓促,书中难免存在不足之处,敬请老师和同学们不吝指正。我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

目 录

第一部分 基础实验

- 实验一 普通光学显微镜的使用及观察真核细胞的形态、
结构 (2)
- 实验二 用高倍显微镜观察叶绿体和细胞质流动及其影响
因素 (15)
- 实验三 显微量尺的使用和细胞大小的测定 (19)
- 实验四 细胞计数板的使用及细胞计数方法 (23)
- 实验五 细胞膜的渗透性 (27)
- 实验六 细胞的凝集反应 (31)
- 实验七 聚乙二醇法诱导鸡血细胞融合 (34)
- 实验八 凋亡细胞的形态学观察 (38)
- 实验九 细胞化学成分的显示 (41)
- 实验十 细胞中 DNA、RNA 的显示 (45)
- 实验十一 小白鼠巨噬细胞吞噬活动的观察 (48)
- 实验十二 线粒体和液泡系的超活染色与观察 (51)

第二部分 综合实验

- 实验十三 细胞分裂的形态观察 (58)

实验十四	光镜下植物细胞骨架的制片技术及观察 …	(65)
实验十五	叶绿体的制备与观察	(68)
实验十六	细胞器的分离与鉴定	(70)
实验十七	动植物细胞有丝分裂染色体标本的制备和观察	(77)
实验十八	动植物细胞染色体分带技术	(82)
实验十九	细胞中多糖和过氧化物酶的定位	(84)
实验二十	电子显微镜演示实验	(88)
实验二十一	血涂片制备及瑞氏染色显示白细胞	(92)

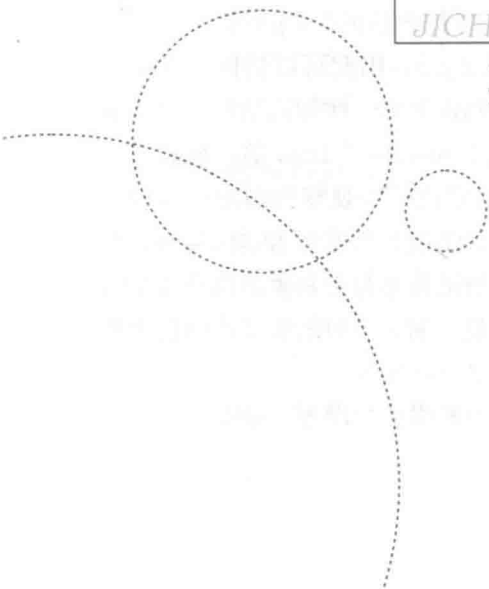
第三部分 附录

附录 1	离心机转数与离心力的换算表	(98)
附录 2	溶液的配制	(99)
附录 3	实验室规则	(108)
附录 4	常用实验动物的了解和解剖器械的使用	(109)
附录 5	细胞生物学实验绘图方法与要求	(112)
参考文献	(113)

第一部分

JICHU SHIYAN

基础实验



实验一 普通光学显微镜的使用及观察真核细胞的形态、结构

一、实验目的

(1) 观察各种细胞器的形态和分布, 在普通光学显微镜下能够识别细胞和细胞器的形态。

(2) 掌握动、植物细胞的一般形态结构特点。

(3) 通过观察各种不同细胞的形态, 了解细胞的分类、进化及分化的特点。

(4) 练习使用显微镜, 巩固和掌握显微镜的使用方法。

二、实验原理

细胞是生命活动的基本结构单位和功能单位。它的体积很小, 如人和动物细胞的直径为 $10\sim 20\ \mu\text{m}$, 而人眼的分辨率是 $100\ \mu\text{m}$, 所以人的眼睛是看不见这些细胞的。细胞内的一些结构的体积更小, 如线粒体、高尔基体、中心体、核仁、染色体等, 用肉眼就更不可能看见, 但它们的大小都在 $0.2\ \mu\text{m}$ 以上, 而一般光学显微镜的最大分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$, 因此可以借助于光学显微镜来观察细胞的外部形态结构和内部的一些细微结构。电子显微镜的分辨率又比光学显微镜的分辨率高了 1000 倍, 能观察到的物体的大小可达到 $0.2\ \text{nm}$, 用它就可以观察到细胞内各种细胞器的细微结构。通常把在光学显微镜下所见到的结构称为显微结构, 而在电子显微镜下所见到的结构称为亚显微结构或超微结构。真核细胞的结构包括: 细胞膜、细胞质和细胞核, 植物细胞除包括以上结构外, 还包括细胞壁和叶绿体。

本实验以相关的永久装片及鱼籽细胞、洋葱、菠菜、新鲜的

黑藻等为材料，观察细胞的形态、结构及细胞质的流动。

三、实验重点和难点

(1)重点：细胞形态、结构的观察，显微镜的使用方法。

(2)难点：各种细胞器的形态和分布。

四、实验仪器、试剂和材料

(1)实验仪器、用具：显微镜，载玻片，盖玻片，滴管，镊子，刀片，培养皿，台灯，铅笔，吸管，牙签，纱布，擦镜纸，解剖刀，眼科剪，小镊子。

(2)实验试剂：瑞氏染色液。

(3)实验材料：菠菜叶、新鲜的洋葱、南瓜幼苗茎表皮毛、美洲鸭跖草雄蕊花丝表皮毛、鸭跖草的蓝色花瓣（用于观察韧皮部筛管细胞中的细胞质流动）、向日葵舌状花花冠的表皮、万寿菊管状花的花瓣表皮、新鲜大白菜内层叶片宽大中脉处的表皮、黄瓜嫩茎的表皮毛、小麦的根、鱼籽细胞、蝶螈表皮细胞装片、蝶螈小肠柱状上皮细胞切片（横切、HE染色）、兔脊神经细胞涂片（示尼氏体，HE染色）、蟾蜍血细胞涂片（甲基绿—派洛宁染色）、小鼠精液涂片（Giemsa染色）、鼠肝切片（HE染色）、草履虫装片、兔脊神经节细胞切片、人口腔黏膜上皮细胞涂片、马蛔虫子宫切片（示中心体）。

五、实验内容和方法

（一）显微镜的主要构造

普通光学显微镜的构造主要分为三部分：机械部分、照明部分和光学部分（图1、图2）。

1. 机械部分

(1)镜座：显微镜的底座，用以支持整个镜体。

(2)镜柱：镜座上面直立的部分，用以连接镜座和镜臂。

(3)镜臂：一端连于镜柱，一端连于镜筒，是取放显微镜时手握部位。

(4)镜筒：连在镜臂的前上方，镜筒上端装有目镜，下端装有物镜转换器。

(5)物镜转换器(旋转器)：接于镜筒的下方，可自由转动，盘上有4~6个圆孔，是安装物镜部位。转动转换器，可以调换不同倍数的物镜，当听到碰叩声时，此时物镜光轴恰好对准通光孔中心。光路接通，即可进行观察。

(6)镜台(载物台)：在镜筒下方，形状有方形、圆形两种，用于放置玻片标本，中央有一通光孔，我们所用的显微镜的镜台上装有玻片标本推进器(推片器)，推进器左侧有弹簧夹，用于夹持玻片标本，镜台下有推进器调节轮，可使玻片标本前后左右移动。

(7)调节器：装在镜柱上的大小两种螺旋，调节时可使镜台上下移动。①粗调节器(粗调螺旋)：移动时可使镜台快速和较大幅度地升降，通常在使用低倍镜时，先用粗调节器迅速找到物象。②细调节器(细调螺旋)：多在运用高倍镜时使用。



图1 普通正置显微镜结构图

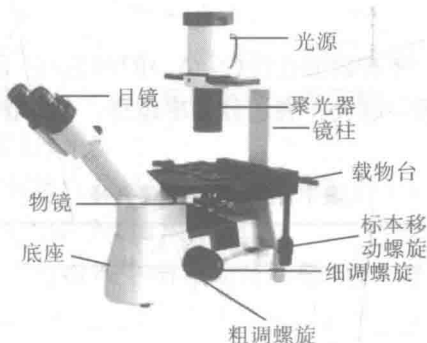


图2 倒置光学显微镜结构图

2. 照明部分

普通光学显微镜的照明部分装在镜台下方，包括光源、集光器。

(1)光源：灯泡或者发光LED管。

(2)集光器(聚光器)：位于镜台下方的集光器架上，由聚光镜和光圈组成，其作用是把光线集中到所要观察的标本上。①聚光镜：由一片或数片透镜组成，起汇聚光线的作用，加强对标本的照明，并使光线射入物镜内，镜柱旁有一调节螺旋，转动它可升降聚光器，以调节视野中光亮度的强弱。②光圈：在聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，其外侧伸出一柄，推动它可调节其开孔的大小，以调节光的亮度和标本的反差。

3. 光学部分

(1)目镜：装在镜筒的上端，通常备有2~3个，上面刻有“5×”“10×”或“15×”符号以表示其放大倍数，一般装的是“10×”的目镜。

(2)物镜：装在镜筒下端的旋转器上，一般有4~6个物镜，其中最短的刻有“10×”符号的为低倍镜，较长的刻有“20×”“40×”符号的为高倍镜，最长的刻有“100×”符号的为油镜，此外，在高倍镜和油镜上还常加有一圈不同颜色的线，以示

区别。

在物镜上，还有数值孔径(N. A.)的标志，它反映该镜头分辨率的大小，其数字越大，表示分辨率越高，各物镜的数值孔径见表1。

表1 各物镜的数值孔径

物镜	数值孔径(N. A.)	工作距离/mm
10×	0.25	5.40
40×	0.65	0.39
100×	1.25	0.11

表1中的工作距离是指显微镜处于工作状态(物象调节清楚)时物镜的下表面与盖玻片(盖玻片的厚度一般为0.17 mm)上表面之间的距离，物镜的放大倍数愈大，它的工作距离愈小。

显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数与目镜的放大倍数的乘积，如物镜为“10×”，目镜为“10×”，其放大倍数就为 $10 \times 10 = 100$ 。

(二)显微镜的使用方法

1. 光路调整

- (1)首先选用“10×”物镜和“10×”目镜。
- (2)把聚光镜升到顶端的位置，孔径光阑调至适中的位置。
- (3)载物台上放置玻片标本，打开光源，调焦清晰。
- (4)视野中出现一个局部照明的区域或亮斑。
- (5)把聚光镜缓慢地上下调节，使视野中的亮斑逐渐变成一个清晰的多边形图像。
- (6)如果光路没有调中，则多边形图像就不在视野中央，需要调整聚光镜旁的一对调中螺丝，把视场光阑多边形的像调至中央位置。
- (7)逐渐开大视场光阑，使多边形图像成为视域的内接多边形，进一步核对调中的状况，如对中不够理想，继续微调对中

螺丝。

(8)将视场光阑再稍稍开大一些,使它的多边形图像恰好消失在视域的边缘上,至此,照明系统调整完毕。

2. 低倍镜的使用方法

(1)将显微镜放在自己左肩前方的实验台上,镜座后端距桌边3~7 cm为宜,便于坐着操作。

(2)对光。用拇指和中指移动旋转器(切忌手持物镜移动),使低倍镜对准镜台的通光孔(当转动听到碰叩声时,说明物镜光轴已对准镜筒中心)。打开光圈,上升集光器,打开电源,适度调节光亮度,直到视野内的光线均匀明亮为止。

(3)放置玻片标本。取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。

(4)调节焦距。用左手按逆时针方向转动粗调节器,使镜台缓慢地上升至物镜距标本片约5 mm处,应注意在上升镜台时,切勿在目镜上观察。一定要从右侧看着镜台上升,以免上升过多,造成镜头或标本片的损坏。然后,用左眼在目镜上观察,左手按顺时针方向缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。

3. 高倍镜的使用方法

(1)选好目标。一定要先在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心,同时把物象调节到最清晰的程度,才能进行高倍镜的观察。

(2)转动转换器,调换上高倍镜,转换高倍镜时转动速度要慢,并从侧面进行观察(防止高倍镜头碰撞玻片),如高倍镜头碰到玻片,说明低倍镜的焦距没有调好,应重新操作。

(3)调节焦距。转换好高倍镜后,用左眼在目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像,可将细调节器的螺旋逆时针

移动约 0.5~1.0 圈，即可获得清晰的物像(切勿用粗调节器)。

如果视野的亮度不合适，可用集光器和光圈加以调节，如果需要更换玻片标本时，必须顺时针(切勿转错方向)转动粗调节器使镜台下降，方可取下玻片标本。

4. 油镜的使用方法

(1)在使用油镜之前，必须先经低倍镜和高倍镜观察，然后将需要进一步放大的部分移到视野的中心。

(2)将集光器上升到最高位置，光圈开到最大。

(3)转动转换器，使高倍镜头离开通光孔，在需观察部位的玻片上滴加一滴香柏油，然后慢慢转动油镜，在转换油镜时，从侧面水平注视镜头与玻片的距离，使镜头浸入油中而又不压破载玻片为宜。

(4)用左眼观察目镜，并慢慢转动细调节器至物像清晰为止。如果不出现物像或者目标不理想要重找，在加油区之外重找时应按：低倍→高倍→油镜程序。在加油区内重找时应按：低倍→油镜程序，不得经高倍镜，以免油沾污镜头。

(5)油镜使用完毕，先用擦镜纸沾少许二甲苯或用乙醚乙醇混合液(7:3)将镜头上和标本上的香柏油擦去，然后再用干擦镜纸擦干净。

(三)显微镜使用的注意事项

(1)持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势，不可单手提取，以免零件脱落或碰撞到其他地方。

(2)轻拿轻放，不可把显微镜放置在实验台的边缘，以免碰翻落地。

(3)保持显微镜的清洁，光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭，切忌口吹手抹或用布擦，机械部分用布擦拭。

(4)水滴、酒精或其他药品切勿接触镜头和镜台，如果沾污应立即擦净。

(5)放置玻片标本时要对准通光孔中央，且不能反放玻片，防止压坏玻片或碰坏物镜。

(6)要养成两眼同时睁开的习惯，以左眼观察视野，右眼用以绘图。

(7)不要随意取下目镜，以防止尘土落入物镜，也不要任意拆卸各种零件，以防损坏。

(8)使用完毕后，必须复原后才能放回镜箱内，其步骤是：取下标本片，转动旋转器使镜头离开通光孔，下降镜台，亮度调至最暗，然后关电源。下降集光器，关闭光圈，推片器回位，盖上绸布和外罩，放回实验台柜内。最后填写使用登记表。

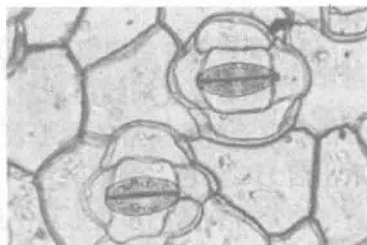
(四)细胞形态、结构的观察

1. 观察植物细胞的形态与结构

(1)观察菠菜叶片表皮细胞及气孔保卫细胞。撕取新鲜菠菜叶片，做成临时装片，在显微镜下观察其表皮细胞及气孔保卫细胞的形态(图3)。



气孔打开



气孔关闭

图3 菠菜气孔形态

(2)洋葱表皮细胞(示植物细胞的形态)的观察。将洋葱鳞茎用小刀切为几块，取一块肉质鳞叶，用镊子在其内表面轻轻撕下一小块膜质表皮，再用剪刀剪成约3~4 mm长的小块，置于载玻片的水滴中，铺平，盖上盖玻片置于显微镜下观察。先在低倍镜下观察，调暗视眼，可见许多长方形的排列整齐的彼此相连的细胞。

选择一形态典型细胞移至视眼中央，换高倍镜观察。细胞壁为细胞最外面的一层由纤维素组成的较厚结构，它是植物细胞特有的结构之一。细胞膜紧贴细胞壁内侧，不易分辨，细胞核位于细胞中央或一侧，呈圆形或椭圆形，核内可见1~2个折光较强的核仁。在较暗视野下，细胞质中可见一至数个充满液体的液泡(图4)。

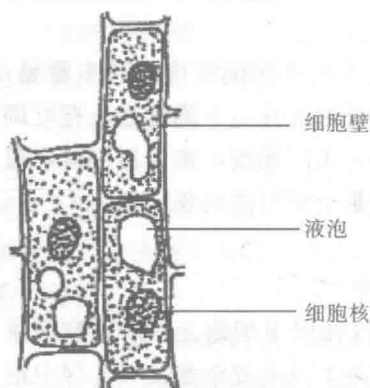


图4 洋葱鳞茎表皮细胞

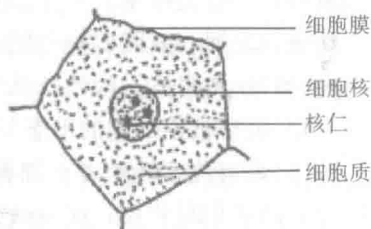


图5 蝾螈表皮细胞

2. 观察各种动物细胞的形态与结构

(1) 蝾螈表皮细胞的观察。取蝾螈表皮细胞装片(HE染色, 方法: 取新鲜取脱落的蝾螈表皮, 用7%甲醛溶液固定4~8h, 取出后HE染色, 制成装片), 先在低倍镜下观察, 可见蝾螈表皮细胞是排列紧的多边形扁平细胞。再换高倍镜观察, 可见染色较浅的细胞边界。细胞核位于细胞中央, 呈圆形, 被染成蓝色, 核内有1个圆形颗粒状的被染成紫红色的核仁, 细胞核内除核仁外还有被染成紫蓝色的块状的染色质(图5)。

(2) 蝾螈小肠柱状细胞的观察。取蝾螈小肠柱状上皮细胞切片(横切、HE染色), 先在低倍镜下观察, 可见蝾螈小肠内层是由排列整齐的柱状细胞组成。再换高倍镜观察, 可见柱状细胞间有清晰的界限, 细胞顶端游离面染色较深, 是由微绒毛组成的刷状缘。细胞核为圆形, 位于细胞中央稍靠基底面, 染成蓝紫色