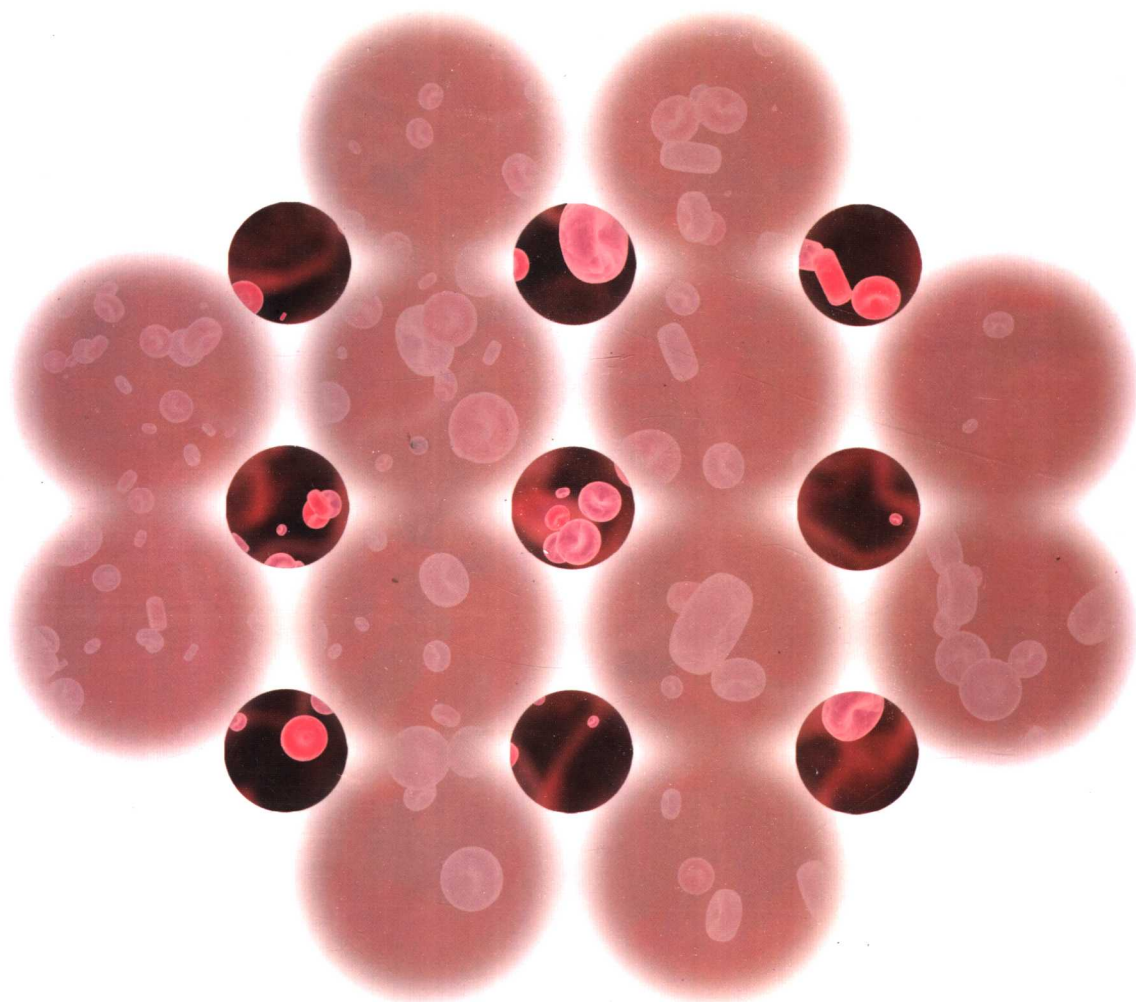


高等医药院校教材
供临床医学等专业用

医学细胞生物学 实验指导

主 编
杨康鹃 | 王振华 |



人民卫生出版社

高等医药院校教材
供临床医学等专业用

医学细胞生物学实验指导

主 编 杨康鹏 王振华

副主编 黄 健 霍满鹏 岳凤珍

编 者 (以姓氏笔画为序)

文苏刚 王建成 王振华 朱 宏 张子波

张 峰 刘俊俊 吴 骅 岳凤珍 金艳花

金雄吉 杨康鹏 战玉竹 黄 健 蒋林彬

蒲力群 慕明涛 霍满鹏

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验指导/杨康鹏等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2005. 8

ISBN 7-117-06963-5

I. 医… II. 杨… III. 医学:细胞生物学-实验
IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 079116 号

医学细胞生物学实验指导

主 编: 杨康鹏 王振华

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 5.75

字 数: 133 千字

版 次: 2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-06963-5/R·6964

定 价: 12.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

《医学细胞生物学实验指导》是《医学细胞生物学》教材的配套实验教材。众所周知,细胞生物学是一门实验性较强的学科,它的任何一项新成果取得都离不开实验。在 21 世纪生命科学领域中,更加显示出细胞生物学技术的重要性和引导科学发展前沿性。在医学理论研究及临床实践研究中也起着极大的作用,尤其是目前医学面临的恶性肿瘤等重大医学问题,最终解决也要依赖细胞生物学研究的突破。

近年来,全国高等医学院校先后为研究生、本科生开设了细胞生物学理论课,而且也以不同学时开设了细胞生物学实验课程,这极大地提高了本学科的教学效果。因为对细胞生物学教学来说,实验课程是一个非常重要组成部分,学生的基本技能,动手能力,创新和探索意识都要通过实验课来实现,尤其培养学生的综合科研素质显得更为重要。为此,能为学生编写一套较好的“医学细胞生物学”实验教材,是我们从事高等医学院校的医学细胞生物学教员长期的愿望。为了这一个共同目的,延边大学医学院、桂林医学院、青岛大学医学院、延安大学医学院、兰州大学五所院校联合编写了这套实验教材,旨在促进医学院校医学细胞生物学实验更好的开设,加强本学科的实验课程内容,培养出适宜 21 世纪的高素质、厚基础、高技术全科型人才。

本实验教材共编入了 25 个细胞生物学实验,分为七大部分,即光学显微镜术与细胞的形态结构、细胞化学与细胞组分的分离、细胞生理、细胞增殖、细胞遗传与细胞凋亡、细胞培养、细胞工程与流式细胞术。在内容的选择上既有较为经典的基础项目,又有反映现代水平的实验,并注意适合各用书学校所能开设的实验项目和内容。体现本实验教材具备实用性、科学性和先进性的特点。尤其当前在全国各高等院校教学改革中,推出鼓励在校学生进行一些探索性实验的科研活动,这是提高在校学生创新意识和科学研究能力的一项很好举措。在学生所设计的课题中所涉及的部分实验方法,可从本实验教材寻找到并可直接采用,这正是本书新颖之处,广而不杂。

在编写过程中,我们注意在实验原理中尽量详细准确,交待实验应用领域及实用价值,力求反映本实验方法在当前是常用而先进(或改良优化)的方法。在实验操作和试剂配制的叙述上力求详尽,以方便学生能独立地完成某些实验项目。鉴于各院校在实验教学学时数和实验条件上不尽相同,使用时可根据各自条件,选择实验项目和实验方法。

由于我们的水平有限,加上编写时间十分仓促,本书难免存在缺点和错误,祈望读者批评和指正。

编 者

2005 年 5 月

目 录

第一部分 光学显微镜术与细胞的形态结构.....	1
实验一 显微镜结构和使用方法.....	1
实验二 细胞的基本形态结构与显微测量.....	6
实验三 细胞器的观察	10
实验四 细胞骨架标本的制备及观察	11
第二部分 细胞化学与细胞组分的分离	14
实验五 细胞内碱性磷酸酶和酸性磷酸酶显示	14
实验六 细胞内碱性蛋白和酸性蛋白显示	15
实验七 过氧化氢酶的显示	17
实验八 DNA 和 RNA 的显示	19
实验九 细胞组分的分离与鉴定	20
第三部分 细胞生理	24
实验十 细胞膜的通透性和细胞吞噬活动观察	24
第四部分 细胞增殖	26
实验十一 细胞有丝分裂标本的制备及观察	26
实验十二 小鼠减数分裂标本的制备及观察	28
实验十三 细胞增殖周期同步化法	30
第五部分 细胞遗传与细胞凋亡	35
实验十四 小鼠骨髓细胞染色体标本的制备及观察	35
实验十五 人外周血淋巴细胞染色体标本的制备及核型分析	36
实验十六 肿瘤细胞染色体标本的制备及核型分析	45
实验十七 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核测定	46
实验十八 细胞凋亡的检测	48
第六部分 细胞培养	52
实验十九 培养细胞的观察、计数及活力测定.....	52
实验二十 动物细胞的原代培养	54
实验二十一 动物细胞的继代培养、冻存及复苏.....	57
实验二十二 干细胞培养技术及应用	59

第七部分 细胞工程与流式细胞术	64
实验二十三 细胞融合	64
实验二十四 染色体提前凝聚(PCC)标本制备及观察	66
实验二十五 流式细胞计量术及应用	68
附录一 实验报告书写的形式和要求	73
附录二 各项实验试剂的配制	74
附录三 英文缩写符号与中文名词对照表	82
主要参考文献	84

第一部分 光学显微镜术与细胞的形态结构

实验一 显微镜结构和使用方法

一、目的要求

- (一) 熟悉普通光学显微镜的主要构造。
- (二) 了解光学显微镜的成像原理。
- (三) 掌握低倍镜和高倍镜的操作方法,并初步学会油镜的使用方法。

二、实验材料和用品

(一) 材料

英文字母装片、毛发交叉装片、血涂片。

(二) 器材

普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、擦镜纸、吸水纸。

(三) 试剂

香柏油(或液状石蜡)、二甲苯。

三、实验内容

(一) 实验原理

光学显微镜简称光镜,是生物学、医学等研究中用于观察微小生物及细胞结构的常用仪器。自从16世纪发明显微镜以来,已广泛应用于对细胞的研究。目前,除广泛使用的普通光学显微镜外,还有荧光显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜和倒置显微镜等特殊功能或用途的光镜。光镜是根据光学原理,采用一组玻璃透镜制作而成。外部光线经反光镜反射入聚光镜,聚光镜将光线会聚在被观察的标本上,照亮标本,便于观察。当光线透射标本进入物镜后,物镜将标本作第一次放大,形成一个倒立的实像。光线再经过目镜进入人眼,目镜将第一次放大的实像作第二次放大,此时便在人的视野中得到一个放大的倒立虚像,成为显微镜的观察图像(图1-1)。

对于任何一台显微镜的性能和质量的高低主要由其分辨率决定的,分辨率指的是区分两个质点间的最小距离,是光镜最重要的性能参数。随着技术的发展,显微镜的分辨率也在不断提高。目前,普通光镜的最大分辨率可达 $0.2\mu\text{m}$ 。

(二) 实验方法

1. 光镜的基本构造与性能 普通光镜在构造上主要包括三部分,即机械部分、光学部分及照明部分(图1-2)。

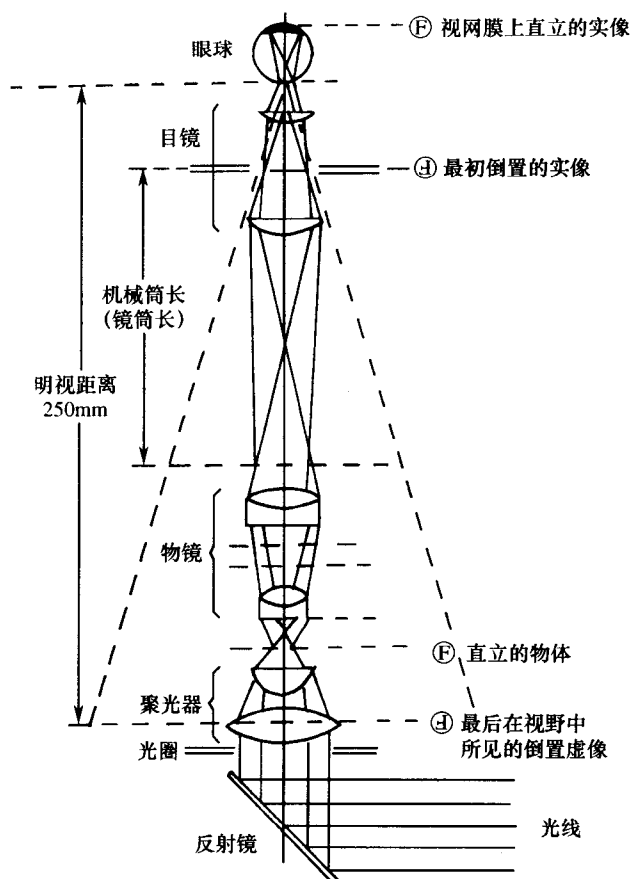


图 1-1 光学显微镜的成像原理模式图

(1) 机械部分

1) 镜筒: 在光镜的最上方的圆筒状结构, 其上端为目镜的安装部位, 下端与物镜转换器相连。镜筒可有单个或两个, 依此光镜可分为单筒式和双筒式两类。

2) 物镜转换器: 为一凸形圆盘状结构, 位于镜筒下方, 其上分布有 3~4 个镜孔, 可安装不同放大倍数的物镜。

3) 镜臂: 握拿显微镜的部位, 其连接并支持镜筒。镜筒直立式光镜在镜筒与其下方的镜柱间有一倾斜关节, 能使镜筒向后倾斜一定角度以便观察。

4) 镜柱: 连接镜臂与镜座的垂直短柱。

5) 调焦螺旋: 也称升降调节器或调焦器, 为调节焦距的装置, 在镜柱的两侧各有一对大小不等的重合螺旋, 分为粗调螺旋和细调螺旋。粗调螺旋可使载物台(或直立式镜筒)较大幅度升降, 一般在低倍镜观察标本时使用; 细调螺旋只能使载物台较小幅度升降, 适用于高倍镜和油镜下观察及低倍镜的精细调焦, 使视野中标本更为清晰, 也常用于对标本不同层次的观察。

在左或右粗调螺旋的内侧靠近镜柱处有一窄环, 称为粗镜筒夹紧螺栓, 转动螺栓, 可调节粗调螺旋的松紧度。另外, 在粗调螺旋的内侧还有一短柄, 称粗调限位环凸柄, 将该

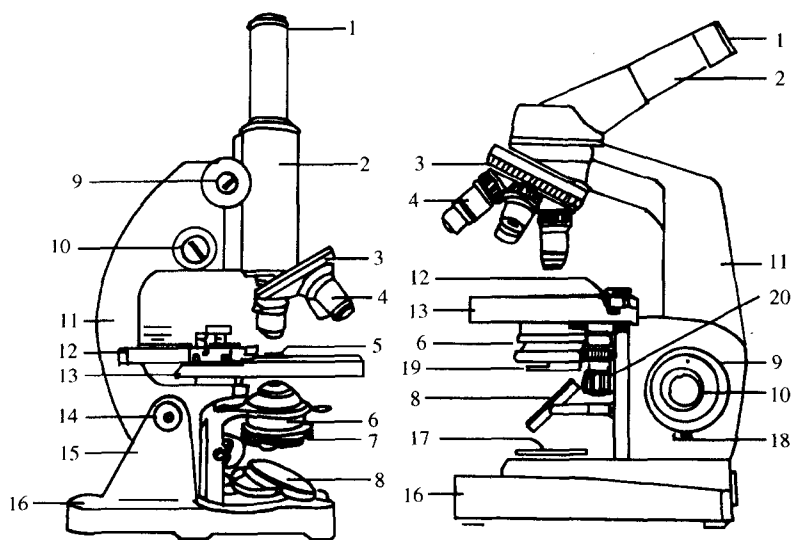


图 1-2 普通光学显微镜结构示意图

1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜 5. 透光孔 6. 聚光器 7. 光圈
8. 反光镜 9. 粗调螺旋 10. 细调螺旋 11. 镜臂 12. 移片器 13. 载物台
14. 倾斜关节 15. 镜柱 16. 镜座 17. 照明装置 18. 粗调限位环凸柄
19. 滤光片 20. 移片器移动螺旋

柄向前推紧,可使粗调螺旋限位,载物台不能再上升,但细调螺旋仍可调节。

6)载物台:也称平台,是位于物镜下方且与镜柱垂直相连的方形台,为被观察的玻片标本放置处。其中央有一透光孔,光线经此孔照亮标本。

7)标本移动器:也称移片器,连接在载物台上方,可移动玻片标本,其上的弹簧夹可固定玻片标本。

移片器上有纵横游标尺,可以确定标本在视野中的位置以及标本移动距离。游标尺由主标尺(A)和副标尺(B)组成。副标尺的分度为主标尺的 $9/10$ 。

8)镜座:为显微镜的底座,可以支撑和稳定显微镜的整体结构。有的显微镜在镜座内装有照明装置等构造。

(2)光学部分

1)目镜:套在镜筒的上端,常见的有 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $15\times$ 的目镜,数字表明目镜的放大倍数为 5 倍、10 倍或 15 倍。目镜通常由两片(组)透镜组成,一般在上下透镜之间的镜筒上粘有一小段细铜丝或头发作为指标,用以指明视野中的被观察标本的位置。目镜放大倍数过大,反而会影响观察效果。

2)物镜:是决定显微镜成像质量和分辨能力的重要部件,其安装在物镜转换器上。根据物镜放大倍数的不同可分为低倍镜、高倍镜和油镜三种。每个物镜上都刻有相应的主要性能参数,如: $10/0.25$ 、 $160/0.17$,表示该物镜的放大倍数为 10,数值孔径为 0.25,160 为 160mm 的镜筒长度,0.17 为所需盖玻片的厚度为 0.17mm。油镜刻有 $90\times$ 或 $100\times$ 字样,另外,还常标有“油”或“oil”字样。从外形上观察不同放大倍数的物镜,可见油镜最

长,高倍镜次之,低倍镜最短。

(3)照明部分 包括聚光器、光圈和反光镜

1)聚光器:位于载物台透光孔下方,由聚光镜和光圈组成,可使光线集中到所要观察的标本上,增加视野亮度。在聚光器的左方有一调节螺旋可使其上升或下降,上升聚光器可使光线增强,反之则光线减弱。

聚光镜由一组透镜组成,具有会聚光线的作用,把光线会聚放大,射向被观察的标本,进入物镜。

光圈,也称虹彩光阑或孔径光阑,位于聚光镜的下方,由一组金属薄片组合而成,外侧有一小柄,可使光圈的孔径变大或缩小,以改变外来光束的直径,调节进光量。光圈开大则光线较强,适于观察颜色深的物体;光圈缩小则光线较弱,适于观察透明或无色的物体。光圈的下方常装有一滤光片圆环,可放置各种颜色的滤光片。

2)反光镜:位于聚光器下方的一个圆形镜面,一面为平面镜,另一面为凹面镜,可以向不同的方向转动,将光线反射入聚光器。凹面镜有反光和聚光的作用,适于光线较弱或油镜下观察标本时使用,平面镜则一般在光线较强或靠近光源时,或在使用低倍镜和高倍镜观察标本时使用。

另外在双目显微镜的镜座上,直接有电光源装置,替代了反光镜。打开电光源开关,电光源就自动将光线反射到聚光器上。采光强弱可用光亮控制钮前后推拉,以达最适光亮度。

2. 光镜的使用方法 使用显微镜时,首先用右手握住镜臂轻轻从镜箱取出显微镜,左手托住镜座,缓慢地放在实验台的中偏左侧,以镜座后端离实验台边缘约3~5cm为宜。

(1)低倍镜的使用

1)调光:转动粗调螺旋,使载物台下降。再转动物镜转换器使低倍镜对准透光孔,当听到轻微扣碰声时,表示镜头到位,目镜与物镜的光轴一致。将光圈完全打开,升高聚光器至载物台同高(或略低),双眼同睁(既可防止眼睛疲劳又可便于绘图),用左眼向目镜内观察,同时转动反光镜,使全视野内为均匀的明亮度。调光时应注意避免直射光源,以免损坏镜头,并损伤眼睛。

2)放置玻片标本:将玻片置载物台上(有盖玻片或标签的一面朝上),用标本移动器上的弹簧夹夹住标本玻片并固定好。然后转动移片器的螺旋,使所观察的标本部位移向透光孔中央。

3)调焦:侧面观察,用粗调螺旋上升载物台,至镜头距玻片约0.5cm处,然后用左眼向目镜内观察,同时慢慢转动粗调螺旋使载物台下降,直至视野中出现物像,再用细调螺旋调至物像清晰为止。然后移动玻片,观察标本的各部位。如果第一次失败,必须严格按上述步骤从头开始。

4)双目瞳距的调节:使用双目显微镜时,首先要调节你本人的双目瞳距。用两只手抓住观察镜面板调节目镜筒间距,直到通过两目镜筒同时看到完整的视场。读出并记住双目镜筒间距刻度值(此值便是你本人在该台显微镜的双目瞳距)。瞳距不对,易使操作者感到疲劳,并影响物镜齐焦。调试右目镜焦距:先读出双目间距刻度值,将右目镜筒刻度圈旋到与双目间距相同读值(有些显微镜的目镜筒不带刻度,便可用调焦器调节右目镜焦

距),闭上左眼或用不透明物遮盖左眼,用细调螺旋仔细调焦显微镜,直到标本对右眼清晰成像,说明右目镜调好;调试左目镜焦距:在调好右目镜基础上,直接调左目镜,先闭上右眼,不需调焦,旋转左目镜筒刻度圈,直到标本对左眼清晰成像。如果目镜瞳距和刻度圈已经调节合适,将得到如下结果:无论看任何标本,用粗调螺旋调焦,左右眼都能看到同样清晰的成像;观察者头部在确定位置通过两目镜可舒适地看到整个视场;将转换器上的物镜换到另一个物镜时,仅需要稍微调细调螺旋,便可获得清晰图像。如果未得到上述结果,应重新调节。为了避免每次使用显微镜都要重复这些调节,应记住你本人双目间距刻度、左右目镜各刻度值。

(2)高倍镜的使用

1)先在低倍镜下找到需观察的物像,将其移至视野中央,同时调节焦距,使物像清晰。

2)从侧面观察物镜,转动物镜转换器,使高倍镜对准透光孔,调节光圈或聚光器使光亮度适宜。再轻微调节细调螺旋便可使物像清晰。一般高倍镜下不再使用粗调螺旋,以防止镜头触及玻片标本而损坏镜头。如需观察新标本,应先转开物镜,下降载物台,取出标本,再放置新玻片,然后重复上述步骤。

(3)油镜的使用

1)在高倍镜下找到需观察的标本,将其移至视野中央。

2)转开高倍镜,在玻片透光孔中央位置处滴一滴香柏油或石蜡油,然后转动物镜转换器使油镜转至工作状态,此时,油镜头与油滴接触或浸在油滴中。也可先下降载物台,将油镜对准透光孔,然后侧面观察,用粗调螺旋缓慢上升载物台,使油镜下端浸入油滴。特别注意不能使油镜压在标本上,更不能用力过猛。

3)目镜观察,缓慢转动细调螺旋使载物台下降直至视野中物像清晰为止。必要时可开大光圈或升高聚光器以增加镜内的视野亮度。

4)使用完油镜,应立即降低载物台,把油镜转向一侧,用干的擦镜纸把镜头上的油擦一次,再用擦镜纸沾少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹,最后再用干擦镜纸擦干净。

显微镜使用完毕后,取下玻片,将各部分还原,反光镜垂直镜座(或关闭电源),物镜转离透光孔,降低聚光镜,罩上布罩放回镜箱。

3. 低倍镜、高倍镜和油镜的使用练习

(1)字母装片的观察:先用眼睛观察装片字母的位置,将有字母的位置对准透光孔,按上述操作方法,先低倍镜,再转到高倍镜观察。

(2)毛发交叉装片的观察:严格按照上述操作方法,先在低倍镜下找到毛发交叉点,将交叉点移到视野中央,再转换高倍镜观察。

(3)血涂片的观察:血涂片一般用瑞氏染料染成蓝紫色,因此只需将有蓝紫色的位置对准透光孔,先在低倍镜下找到细胞,换到高倍镜观察,再用油镜观察。

(三) 注意事项

1. 取用显微镜时,应轻拿轻放,一手握镜臂,一手托住镜座,切勿一只手斜提,以避免目镜和其他零部件滑落。

2. 目镜不可随便取出以免灰尘落入镜内影响观察,显微镜的其他零部件也不可随意拆卸,以免丢失或损坏。

3. 显微镜的光学部件只能用擦镜纸轻轻向一个方向擦拭,不可用纱布、手帕或普通

纸揩擦,以免损坏镜头。

4. 在使用显微镜观察标本时,不能一边在目镜中观察,一边上升载物台,以避免镜头与玻片接触,损坏镜头或玻片标本。观察时,应两眼同睁、双手并用,反复多次练习,做到能够一边观察,一边计数或绘图记录。

5. 显微镜使用完毕后应及时复原。先下降载物台,取下玻片,使物镜转离透光孔,反光镜垂直镜座,然后放回镜箱。

四、思考题及作业

1. 使用显微镜观察标本时,为什么必须按从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?
2. 目镜在显微镜的成像上起何作用? 如何判断视野中所观察到的污点是在目镜上?
3. 正确使用光镜,应注意哪些基本问题?
4. 绘出光镜结构示意图并注明各部分的名称。

(霍满鹏 慕明涛)

实验二 细胞的基本形态结构与显微测量

一、目的要求

- (一) 熟悉光学显微镜下植物细胞和动物细胞的基本形态结构。
- (二) 掌握临时制片和显微绘图的方法。
- (三) 熟悉细胞的显微测量方法。

二、实验材料和用品

(一) 材料

洋葱鳞茎、人体口腔颊部黏膜上皮细胞。

(二) 仪器

光镜、目镜测微尺、镜台测微尺、载玻片、盖玻片、牙签、小镊子、吸管、解剖刀、纱布、吸水纸、擦镜纸。

(三) 试剂

1%伊红染液、0.5%次甲基蓝染液、1%碘液、生理盐水。

三、实验内容

(一) 实验原理

所有需观察的细胞都应放置到无色透明的载玻片上制备成临时或永久玻片标本后,才适于在光镜下观察,大多数情况下还需在细胞或组织上加盖一张盖玻片,以起到保护标本和显微镜镜头等作用。

(二) 实验方法

1. 洋葱表皮细胞临时标本的制备和观察

(1) 临时标本制备:取一载玻片,用左手的中指和拇指将其长轴的两端夹住,右手用食

指和拇指夹取一块洁净的纱布在玻片的上下面均匀地擦拭,直到透明为止,盖玻片的擦拭方法与载玻片相同,但盖玻片小而薄,擦拭时需格外小心,用力要均匀,否则容易破碎。

在擦拭干净的载玻片中央滴一滴伊红染液,将洋葱鳞茎用解剖刀分成几块,取一块肉质鳞茎的鳞片,用刀在其凹面划一 $3\sim 4\text{mm}^2$ 的小块(边长最好不超过 5mm),再用镊子撕下很薄的一片表皮,置于载玻片的染液中,铺平,盖上盖玻片,用吸水纸吸去盖玻片周围多余的染液,即制备好了洋葱表皮细胞临时标本。

(2)观察:将临时标本置于显微镜的载物台上,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,如图 2-1 所示。选择其中一个较典型的细胞移至视野中央,再换高倍镜仔细观察以下结构:

1)细胞壁(cell wall):为细胞最外面的一层由纤维素组成的较厚的结构。它是植物细胞的重要特征之一。

2)细胞膜(cell membrane):位于细胞壁内侧并与其紧密相贴,光镜下二者不易分辨。

3)细胞核(nucleus):位于细胞中央,呈椭圆形,被染成红色,成熟的细胞由于液泡挤压,核位于质膜边缘,调节细螺旋,可见核内有1~2个被染成深红色的核仁(nucleolus)。

4)细胞质(cytoplasm):是细胞膜和细胞核之间的区域,其中可见一至数个充满液体的小泡,称为液泡(vacuole),液泡在细胞内呈大小不一的圆形透明区域。细胞质中还可可见微细的颗粒。

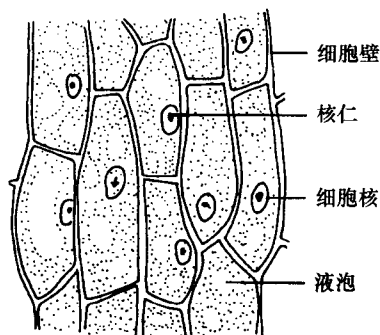


图 2-1 洋葱表皮细胞示意图

2. 人体口腔颊部黏膜上皮细胞临时标本的制备和观察

(1)临时标本制备:在擦拭干净的载玻片中央滴一滴生理盐水,取清洁牙签,用其钝端在自己口腔的面颊黏膜上轻轻地刮取少许黏液,均匀地涂在载玻片上的生理盐水中,加一滴次甲基蓝染液或碘液,用小镊子夹取一盖玻片,使其左侧边缘与载玻片上的液体充分接触,慢慢盖下,以免产生气泡,用吸水纸吸去盖玻片周围多余的染液。

(2)观察:将临时标本置于显微镜的载物台上,先用低倍镜观察,并注意调节光线的均匀度,在观察到蓝色(或金黄色)细点后,选择分散良好不重叠和轮廓完整而清楚的部分移至视野中央,再换高倍镜仔细观察,如图 2-2 所示。人体口腔颊部黏膜上皮细胞的形状是不规则的,细胞膜薄而不显著,细胞中央有一卵圆形的细胞核,在核中有时可见一个致密的结构,即核仁。

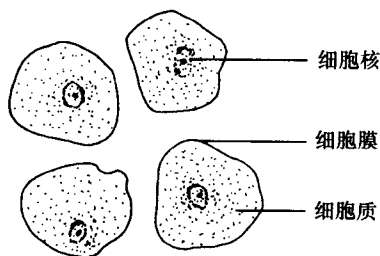


图 2-2 人体口腔颊膜上皮细胞示意图

注意将人体口腔颊部黏膜上皮细胞与洋葱表皮细胞结构比较区分。

3. 人体口腔颊部黏膜上皮细胞的显微测量 细胞的大小,一般可用显微测微尺加以测量,显微测微尺由镜台测微尺和目镜测微尺组成,镜台测微尺是一种被圆形盖玻片封固

在特制载玻片中央的具有刻度的标尺,标尺全长为 1mm,有 100 等分的小格,每小格的长度为 0.01mm(10 μ m);目镜测微尺是一放在目镜内的玻璃圆片,其上刻有 50 个等分的刻度,每一刻度(小格)的实际长度是随不同物镜的放大倍数和镜筒的不同长度而改变的,如图 2-3 所示。所以在使用前,应在所采用的放大倍数的物镜下,用镜台测微尺加以标定后,才能代表其实际长度。具体方法如下:

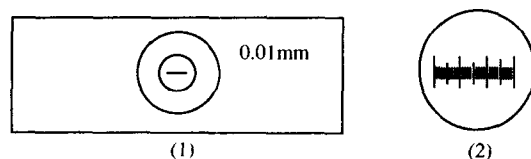


图 2-3 镜台测微尺和目镜测微尺

(1)镜台测微尺 (2)目镜测微尺

(1)将镜台测微尺刻度朝上置于载物台中央,先用低倍镜观察,调焦看清刻度的全长,如有十大格,每大格又分 10 小格,每小格为 0.01mm(10 μ m)。

(2)取下目镜,旋下目镜上面的透镜,然后将目镜测微尺有刻度的一面朝下放入目镜筒内,再旋上目镜的透镜。

(3)转动目镜和移动镜台测微尺,使两标尺平行,即目镜测微尺的“0”刻度和镜台测微尺的“0”刻度重合,然后从左向右看两刻度线的重合处,记录重合处目镜测微尺和镜台测微尺的刻度,即可计算出目镜测微尺每小格的长度。

目镜测微尺每小格实际长度(μ m)=镜台测微尺刻度/目镜测微尺刻度 $\times$ 镜台测微尺每小格长度。

如低倍镜下所标定的目镜测微尺 20 格相当于镜台测微尺 40 格,即可求出目镜测微尺的每小格等于 20 μ m。如图 2-4 所示。

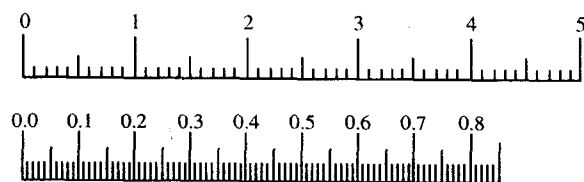


图 2-4 目镜测微尺的标准

上:目镜测微尺 下:镜台测微尺

用同样方法可测得高倍镜和油镜下目镜测微尺每小格的实际长度。

(4)取下镜台测微尺,换上需要测量的玻片标本,用目镜测微尺的刻度来测量细胞长度(格数),所得的细胞长度(格数)乘以每刻度的 μ m 数,即为细胞的实际长度。

(5)在测量过程中,为了避免细胞之间误差,一般要求分别测量 5 个细胞的长径和短径,列表记录并算出其平均值。

(三) 结果分析

1. 洋葱表皮细胞临时标本的制备和观察结果

(1)制备成功的洋葱表皮细胞临时标本可在显微镜下清楚地观察到染成红色的细胞壁、细

胞膜、细胞核、及不上色的细胞质及液泡等结构,甚至也可观察到染成深红色的核仁。

(2)如果镜下结构有重影或厚重、模糊不清,一般是洋葱表皮取材过厚,将皮下组织一起带上了,这种情况需重新切取表皮,制备新的临时标本,进行观察。

(3)如果镜下有大的气泡形成,遮挡细胞结构,干扰观察,一般是在制备临时标本时,盖玻片盖压不够仔细,未将气泡完全排出造成的,这种情况亦需重新制备标本,以便获得好的观察图像。

2. 人体口腔颊部黏膜上皮细胞临时标本的制备和观察结果

(1)人体口腔颊部黏膜上皮细胞好的临时标本,在低倍镜下很容易观察到均匀分布的点状细胞,选择合适的视野,换高倍镜观察,就可清楚地观察到染成蓝色的细胞核及细胞内部结构。

(2)如果在低倍镜视野下,很难找到点状的细胞,一般是刮取口腔颊部黏膜时用力过轻,根本没有取到细胞,这种情况需重新取材制备临时标本,才可观察到口腔颊部黏膜细胞的结构,并进行细胞大小的测量。

(3)如果镜下有大的气泡形成,遮挡细胞结构,干扰观察,一般也是因为在制备临时标本时,未将气泡完全排出造成的,这种情况亦需重新制备标本,以便获得好的观察图像。

3. 人体口腔颊部黏膜上皮细胞的显微测量结果

在测量过程中,需分别测量 5 个人体口腔颊部黏膜上皮细胞的长径和短径,记录在表 2-1 中,并算出其平均值,才可得出人体口腔颊膜细胞的客观尺寸。

表 2-1 人体口腔颊部黏膜上皮细胞长径、短径及其平均值(μm)

编号	1	2	3	4	5	平均值
长径						
短径						

(四) 注意事项

测微尺使用后,需用擦镜纸轻轻擦干净,有刻度的平面不要接触硬物及手指,放入塑料盒中置于干燥处保存。

四、思考题及作业

1. 细胞测量时,在低倍镜下标定目镜测微尺的长度,转换高倍镜测量细胞长度,是否需要重新标定? 为什么?
2. 通过观察及绘图,你认为真核细胞的结构有何特点? 植物细胞与动物细胞结构有何不同。
3. 绘制洋葱表皮细胞、人口腔颊部黏膜上皮细胞图,并注明各部分结构名称。
4. 列表记录 5 个人口腔颊膜上皮细胞的长径和短径,并算出其平均值。
5. 分别求出使用低倍镜(10×),高倍镜(40×)时目镜测微尺每格代表的长度:
低倍镜:目镜测微尺每格代表的长度= ×10(μm)= μm
高倍镜:目镜测微尺每格代表的长度= ×10(μm)= μm

(黄 健)

实验三 细胞器的观察

一、目的要求

- (一) 观察并熟悉光镜下线粒体、高尔基复合体和中心体的形态特征。
- (二) 了解线粒体的活体染色方法。

二、实验材料和用品

(一) 材料

洋葱鳞茎、人口腔黏膜上皮细胞、蛙肾脏切片、兔脊神经节切片、马蛔虫子宫横切片。

(二) 器材

光学显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、牙签、剪刀、吸管、擦镜纸、吸水纸。

(三) 试剂

1/5000 詹纳斯绿 B 染液、二甲苯。

三、实验内容

(一) 实验原理

真核细胞内存在多种具有特殊形态结构和功能的细胞器,如:线粒体、高尔基复合体、溶酶体、中心体、微管、微丝等。有些外层由膜包裹,这些细胞器称为膜性细胞器,而有些外层无膜包裹,则称为非膜性细胞器。有些细胞器体积较大,通过不同的染色方法可在光镜下观察到,这些在光镜下常可见的结构称为细胞的显微结构,而有些由于体积非常小,只能在电镜下才能观察到,这样的结构称为亚显微结构。

在光镜下可见线粒体的形态是多种多样的,呈线状、粒状、圆形、哑铃形、星形、分枝状等。线粒体形态的不同与细胞的种类和所处的生理状态不同有关。线粒体内含有细胞色素氧化酶,当用詹纳斯绿 B(Janus Green B)对线粒体作活体染色时,线粒体呈现蓝绿色,而其周围的细胞质则呈无色。在光镜下很容易观察到这种呈现特殊颜色的线粒体。

高尔基复合体在光镜下呈网状、点状或线状结构。神经组织切片中的高尔基复合体被硝酸银染成棕褐色,可在光镜下看到其形态。

中心体在光镜下呈球状或点状颗粒,包括中心球和中心粒。光镜下观察经铁苏木精染色的马蛔虫子宫切片,可见到位于卵细胞两极的中心体。

(二) 实验方法

1. 线粒体的观察

(1) 蟾蜍肾细胞线粒体的观察:将蛙肾脏切片标本置于低倍镜下观察,可见许多圆形或椭圆形的肾小管横切面。每一肾小管的管壁由单层紧密排列的上皮细胞组成,中央为管腔。细胞之间的界限一般比较模糊,难以分辨,但可大致确定细胞的范围。在高倍镜和油镜下观察,可见一染色较浅的圆形细胞核,内有一被染成蓝色的核仁。在细胞质中有许多蓝黑色线状或颗粒状的结构,即为线粒体(图 3-1)。

(2) 人口腔黏膜上皮细胞线粒体的活体染色及观察:将洁净的载玻片平放在实验台

上,在玻片中央部位滴 2 滴 1/5000 詹纳斯绿 B 染液,用消毒牙签刮取口腔颊部黏膜细胞于染液中混匀,盖上盖玻片,染色 3~10min。显微镜观察,在高倍镜下可见口腔黏膜上皮细胞的细胞质中散在一些亮绿色的短杆状或颗粒状的线粒体。

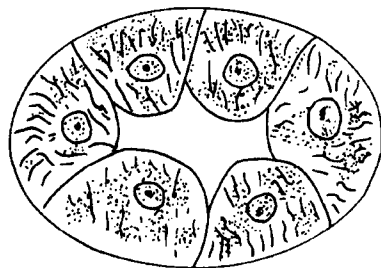


图 3-1 蟾蜍肾小管上皮细胞
线粒体模式图

(3)洋葱细胞线粒体的活体染色及观察:将洁净的载玻片平放工作台上,滴 2 滴詹纳斯绿 B 染液。用镊子小心撕下洋葱鳞茎内侧面一小块表皮,放入载玻片上的染液中并使其平展,染色 10~20min,吸管吸取蒸馏水滴于染色的载玻片上,冲淡染液,盖上

盖玻片,再用吸水纸吸去多余水分。将制好的洋葱表皮组织装片标本放显微镜下,先低倍镜观察到形态和着色良好的细胞,再转到高倍镜下观察,可见蓝绿色颗粒状或线条状结构,即为线粒体。

2. 高尔基复合体的观察 将兔脊神经节切片标本放置在低倍镜下观察,可见圆形或椭圆形的神经节细胞。选择轮廓完整的神经细胞移至视野中央,转用高倍镜或油镜观察,可见多数细胞内高尔基复合体成群分布在细胞核的周围,呈棕褐色颗粒状、线状或卷曲成网状。细胞核是细胞中央不被着色的圆形或椭圆形区域。

3. 中心体的观察 在显微镜下观察马蛔虫子宫横切片标本,寻找处在分裂中期的卵细胞,可见马蛔虫卵细胞的两极各有一个染色极深的小颗粒,即为中心粒。中心粒的周围是透明的细胞质区为中心球,中心球和中心粒共同组成中心体。中心体的外周有呈放射状的星射线,两中心粒间有呈梭形的纺锤体。细胞分裂期中心体在光镜下很容易观察到,而间期细胞则很难看到。

四、思考题及作业

1. 简述线粒体的活体染色原理。
2. 绘制在光镜下观察到的蛙肾细胞、人口腔黏膜上皮细胞线粒体的形态结构。
3. 绘制在光镜下观察到的兔神经节细胞高尔基复合体的形态结构。

(蒲力群)

实验四 细胞骨架标本的制备及观察

一、目的要求

- (一) 掌握细胞骨架的显示方法。
- (二) 了解光镜下细胞骨架的基本形态结构。

二、实验材料和用品

(一) 材料

玻片培养的小鼠肺成纤维细胞、洋葱鳞茎。