

汪德耀 主编

细胞生物学实验技术与方法

细胞生物学实验

洪满贤 林加涵 编著

厦门大学出版社

主编 汪德耀

细胞生物学实验技术与方法

细胞生物学实验

洪满贤 林加涵 编著

厦门大学出版社
一九九五年八月

[闽]新登字 09 号

主编 汪德耀

细胞生物学实验技术与方法

细胞生物学实验

洪满贤 林加涵 编著

*

厦门大学出版社出版发行

福建沙县印刷厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 9.125 印张 230 千字

1995 年 8 月第 1 版 1995 年 8 月第 1 次印刷

印数:1—1000 册

ISBN 7-5615-1076-4/Q·30

定价:10.00 元

前 言

细胞生物学是生命科学的基础,细胞生物学的发展又是建立在细胞生物学实验技术方法的不断创新的基础上的。当代细胞生物学实验技术日新月异,并已发展至分子水平。为使细胞生物学教学适应这一发展趋势,我们在厦门大学生物系历年本科生、助教进修班、骨干教师培训班的细胞生物学实验课教材的基础上,经多次修改并补充一些细胞生物学实验的新技术、新方法而编写成本书。本书共五篇 45 个实验,系统介绍了光学显微镜与电子显微镜技术、细胞培养、染色体技术、细胞化学与免疫组织化学、细胞组份分离与纯化、同位素技术、细胞杂交、原位核酸分子杂交等。对每个实验的基本原理、必要的设备、具体操作流程等作了较为详细的介绍。

本书是《普通细胞生物学》(汪德耀主编,上海科学技术出版社,1988)的配套教材,可供各高等院校作细胞生物学实验课的教材或参考书,也可供有关科研人员使用。

本书由汪德耀主编,洪满贤和林加涵编著。在汪德耀教授的领导下,洪满贤编写实验 8—16、24—31、34—45;林加涵编写实验 1—7、17—23、32、33。由于学识水平和经验所限,本书不足之处在所难免,恳请专家、读者批评指正。

编著者

1995.2 于厦门大学

目 录

第一篇 细胞形态结构的观察

实验一	细胞一般形态结构和大小的观测	(1)
实验二	相差显微镜的活细胞观察	(10)
实验三	细胞的暗视野显微镜观察	(15)
实验四	细胞的荧光显微镜观察	(19)
实验五	液泡系的活体染色和高尔基体的观察	(25)
实验六	线粒体的分离和活体染色的观察	(33)
实验七	叶绿体的分离和观察	(42)
实验八	核糖核蛋白体的分离	(44)
实验九	微丝的观察	(49)
实验十	细胞核与染色质的分离和观察	(53)
实验十一	中期染色体的分离和观察	(61)
实验十二	核骨架的分离和观察	(65)
实验十三	细胞质膜的分离和观察	(69)
实验十四	人类染色体标本的制备和高分辨显带技术	(74)
实验十五	植物染色体 N-带技术	(83)
实验十六	透射电镜细胞样品的制备和观察	(86)

第二篇 细胞化学组分的测定

实验十七	显示 DNA 的细胞化学方法	(95)
实验十八	DNA 显微分光光度测量法	(103)
实验十九	显示 RNA 的细胞化学方法	(113)

实验二十	蛋白质的细胞化学显示法·····	(118)
实验二十一	过碘酸雪夫反应(PAS)显示糖原和其他多糖物质 ·····	(125)
实验二十二	脂类的细胞化学显示法·····	(132)
实验二十三	显示碱性磷酸酶的细胞化学方法·····	(139)
实验二十四	显示微管蛋白的间接免疫荧光方法·····	(149)
实验二十五	显示 rDNA 活性的核仁组成区银染方法(Ag-NOR) ·····	(153)

第三篇 细胞培养

实验二十六	动物细胞的原代培养·····	(156)
实验二十七	动物细胞的传代培养·····	(164)
实验二十八	植物细胞与组织培养·····	(167)
实验二十九	植物原生质体的分离和培养·····	(174)
实验三十	细胞克隆培养·····	(182)
实验三十一	培养细胞的冻存·····	(186)

第四篇 细胞生理活动的观测

实验三十二	红细胞膜的渗透性观察·····	(190)
实验三十三	离子通透红细胞膜的流速测定·····	(194)
实验三十四	细胞电泳·····	(204)
实验三十五	鞭毛微管的装配·····	(212)
实验三十六	细胞 DNA 合成和细胞周期的显微放射自显影测定 ·····	(216)
实验三十七	^3H -TdR 掺入 DNA 的液闪测定 ·····	(225)
实验三十八	癌细胞的诱导分化·····	(228)
实验三十九	微核测定·····	(232)

第五篇 细胞工程方法

实验四十	显微注射技术·····	(237)
实验四十一	微小细胞的制备·····	(242)
实验四十二	动物细胞融合·····	(247)
实验四十三	植物原生质体融合·····	(257)
实验四十四	B淋巴细胞交瘤技术·····	(261)
实验四十五	细胞原位核酸分子杂交·····	(271)

1. 观察前的准备工作

(1) 观察者要养成显微镜镜检的工作习惯, 观察时要双眼同时睁开, 一边观察一边进行计数、记录或描绘。

(2) 观察时所用的材料、药品和各种器具要预先准备好。

(3) 显微镜在使用之前应检查一下它的各个部件是否完整和正常, 并对载物台、目镜、物镜以及聚光器上端透镜进行必要的清洁工作。然后进行合轴调节, 其操作步骤如下:

① 可变光栏的中心对准聚光镜的中心。如果可变光栏的水平是固定的, 则装配时已保证它与聚光镜合轴, 不必调整; 如果可变光栏的水平位置可以移动, 则应把可变光栏关到最小, 使它的中心孔对准聚光镜下方的透镜中心。

② 载物台上放置观察标本, 把聚光器上升到它上端透镜平面稍低于载物台平面的高度, 并将它的可变光栏开到最大, 转低倍物镜, 进行调焦到能看见标本, 可调反射镜使视野得到最亮和最均匀的照明, 或把光栏关小, 最亮的照明区正处在视野的中央。

③ 转到高倍镜, 并调焦到看清标本, 然后去掉标本, 拔出目镜, 眼睛直接向镜筒观察, 并把可变光栏关小, 其亮点是否在视野中心, 如果不是, 就要转动聚光器的调节螺旋, 把亮点调到视野中央, 再慢慢开启可变光栏, 使视野看到光栏边缘和聚光镜的边缘相接为止。

2. 显微镜的照明操作

显微镜的照明方法有两种: 一是从标本下方射入照明光线, 叫做透射照明法, 如果照明光束与显微镜光轴平行, 则称为中心照明法。如果照明光束与显微镜光轴成某种角度, 则称斜射照明法。另一是从被检物体上面投射照明光线, 叫做落射照明法。显微镜最常用的是中心照明法, 其方法如下:

(1) 当用天然光、日光灯、各种没有会聚透镜及光栏的显微镜灯或普通台灯照明时, 因射来的光束宽, 也比较均匀, 操作比较简

单,其步骤是:

①先使显微镜正对光源,让反射镜镜面充分接受射来的光,把聚光器上升到它上端透镜平面稍低于载物台平面的高度。

②将低倍镜转到工作位置上,在载物台上放一标本片,把聚光器下的可变光栏开到最大,调节反射镜,使光线透过标本进入物镜。

③调焦到能看清标本,去掉标本后,再仔细调节反射镜,使视野得到最亮和均匀的照明,或照明最亮的区域正处在视野中央,然后进行其他操作步骤。

(2)当使用带有会聚透镜和可变光栏的显微镜灯时,虽然也可以照上述方法取得一般照明效果。但要得到均匀而较强的照明,则应采用柯勒(Köhler)照明法。

显微镜的光源装置在镜座中的,开启光源开关,把灯光亮度调到3—4档(或3V)即可。

3. 聚光器和物镜配合的操作和滤光片的选择

(1)聚光器与物镜不但其性能要相匹配,而且两者的数值孔径要相一致。所以,在完成上述照明的操作之后,对无标明数值孔径的聚光器,先取下目镜,直接向镜筒中看,把聚光器下的可变光栏关到最小,然后再慢慢地开大,至它的口径与视场的直径恰好一样大。最后安上目镜,选用适当的滤光片,即可进行观察。每转换另一物镜,都要随着进行一次这样的配合操作。如果聚光器上有数值孔径值的话,应根据所用物镜的数值孔径值作相应的调整,使两者的孔径数值一致。

(2)滤光片的选用

根据观察的目的要求,采用合适的滤光片,有如下选择:

①防止耀眼和减轻眼睛疲劳。当光线太强耀眼难受时,单为了削减入射光,可采用乳白玻璃或白色毛玻璃滤光片。最好根据标本染色的情况,选用一个绿色、黄绿色或蓝绿色的滤光片,把能刺激

眼睛的红光吸收掉,以减轻眼睛的疲劳。

②增进分辨力。将白光中波长较长的光波吸收掉,而利用所通过的较短波长来照明,可以增进分辨力。例如用一个绿色或蓝色的滤光片就可以达到目的。

③增大明暗反差。当需要利用标本的反差来识别其结构时,就要通过合适的照明来加强反差,其方法是选用一个颜色与标本颜色互补的滤光片。各种颜色的互补色可见表 1-1。

4. 观察操作

在完成上述各步的操作之后,便可放上待检的标本片在载物台上,进行调焦和观察。

(1)低倍、高倍镜的使用:先把低倍物镜用粗调焦螺旋下降至离盖玻片 0.5cm 处,然后一边观察视野一边上升物镜,直至看到图像,再将标本移到视野的中心,用细调焦螺旋把物镜调至最清晰处,若要用高倍镜观察时,把所要进一步放大观察的部位移至视野中央,直接顺时针转换成高倍物镜,然后用细调焦螺旋调焦,至看清物像。

表 1-1 各种颜色光的波长及其互补色

颜 色	波长(nm)	互补色
紫	380—430	黄
蓝	430—490	
青	490—510	橙
		红
绿	510—570	紫红
黄	570—600	紫蓝
橙	600—620	青
红	620—750	

(2)油镜的使用:先用低倍物镜观察标本的概况,然后更换高倍镜,并把需要用油镜观察的部位移到视野的正中央,再进行油镜观察操作:

①把镜筒向上提升约 1.5cm(有的是载物台向下降 1.5cm),再把油镜转到工作位置。

②在聚光器和盖玻片上所要观察的位置各滴一小滴香柏油或石蜡油,一边从侧面观察油镜头,一边细心拧动粗调焦螺旋,使油镜头的前端与油滴接触,再慢慢下降油镜,使其前端接近而没有碰到盖玻片为止,最后,一边观察视野中的图像,一边拧动细调焦螺旋,使镜筒稍为上下升降看清标本。

③观察完毕后,提升物镜约 1cm,把油镜转离光轴,及时做清洁工作。油镜先用干的擦镜纸擦 1—2 次,把大部分油去掉,再用清洁剂(70%乙醚+30%无水乙醇)或二甲苯滴湿的擦镜纸擦 2 次,最后用干擦镜纸擦 1 次。擦拭要小心,动作要轻,聚光器上的油滴也用同样方法处理。擦拭时要顺镜头的直径方向,而不要沿镜头的圆周擦,载玻片上的油可用“拉纸法”擦净,即把一小张擦镜纸盖在载玻片的油滴上,在纸上滴一些清洁剂或二甲苯,趁湿把纸往外拉,这样连续作了 3—4 次,即可干净。

最后把聚光器下降约 1cm,把物镜转离光轴,使镜筒下端正处在两个物镜之间,置于阴凉干燥处保存。

(二)OLympus 显微镜观察的顺序操作(以 BH5 为例)(请参阅图 1—1)

1. 将电源开关置于 ON 的位置。
2. 电压调至 7~9V。
3. 将 LBD-2 滤色镜放入灯室前的窗口,根据亮度选用适当的 ND 滤色镜放入灯架一侧。
4. 把标本放在载物台上。
5. 用物镜 10×对准焦点。

6. 调节双目镜筒的间距,以适合观察者的两眼瞳距,同时调整两眼的屈光度。

7. 缩小视场光阑(约视场的 $\frac{1}{3}$)。

8. 将聚光镜上下移动调节,对准视场光阑焦点。

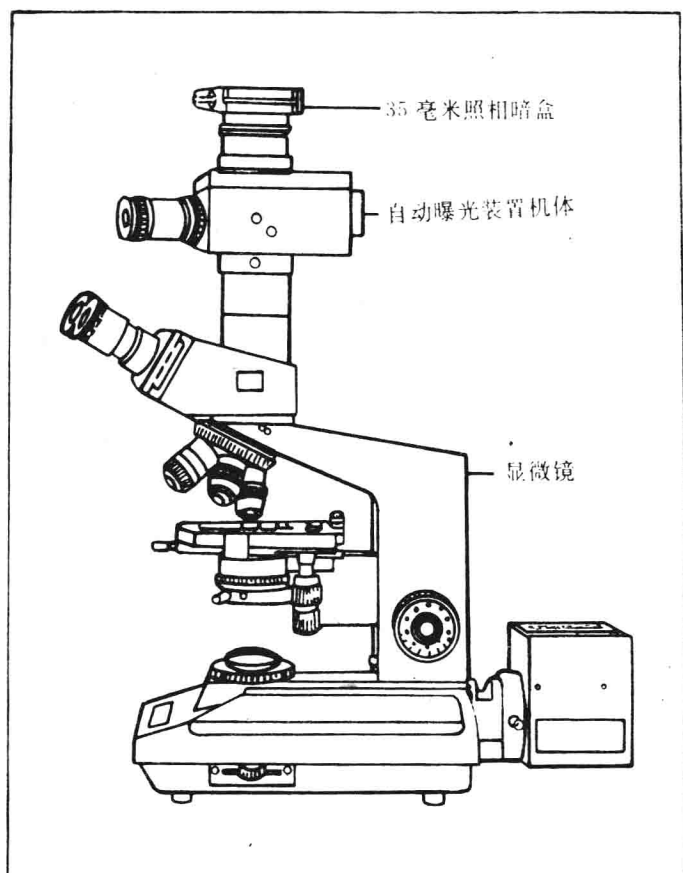


图 1-1 Olympus 显微镜(BHS 型)

9. 用两个调整螺钉把聚光镜的中心调整到视场的中心。
10. 把视场光阑调整到与目镜的视场外接的附近。
11. 使用低倍镜,转动载物台的移动标尺,找出标本观察的位置。
12. 如果已找到观察位置,则更换物镜(高倍或油镜),按所要求的放大倍数进行观察。

(三)测微尺的使用操作

测微尺分目镜测微尺和镜台测微尺。目镜测微尺是一块圆形玻璃片,中心刻有一线,长 5—10mm,分成 50~100 格,每格的实际长度因不同物镜的放大率和不同镜筒长度而异。镜台测微尺是在一块载玻片中央,用树胶封固一圆形的测微尺,长 1—2mm,分成 100—200 格,每格实长 0.01mm($10\mu\text{m}$)。当用目镜测微尺来测量细胞的大小时,必须先用镜台测微尺核实目镜测微尺每一格的长度。其操作步骤如下:

1. 卸下目镜的上透镜,将目镜测微尺刻度向下装在目镜的焦平面上,再旋上目镜的上透镜。
2. 将镜台测微尺刻度向上放在载物台上夹好,使测微尺分度位于视野中央。调焦至能看清镜台测微尺的分度。
3. 小心移动镜台测微尺和目镜测微尺(如目镜测微尺分度模糊,可转动目镜上透镜进行调焦),使两尺左边的一直线重合,然后由左向右找出两尺另一次重复的直线(图 1—2)。

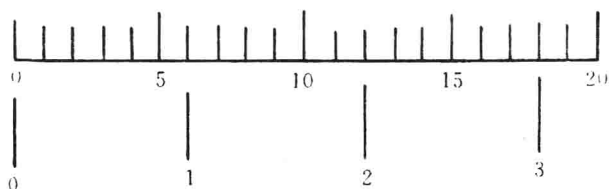


图 1—2 测定目镜测微尺每格实长的图解

上尺:目镜测微尺 下尺:镜台测微尺

4. 记录两条重合线间目镜测微尺和镜台测微尺的格数。按下式计算目镜测微尺每格等于多少微米：

$$\frac{\text{目镜测微尺}}{\text{每格的微米数}} = \frac{\text{镜台测微尺的格数}}{\text{目镜测微尺的格数}} \times 10$$

例如图 1-2 中镜台测微尺 1 格等于目镜测微尺 6 格，代入公式得：

$$\text{目镜测微尺每格} = \frac{1}{6} \times 10 = 1.66(\mu\text{m})$$

5. 取下镜台测微尺，换上需要测量的玻片标本，用目镜测微尺测量细胞的大小。

(四) 细胞形态和大小的观测

1. 兔肝细胞苏木精—伊红(H. E.)染色玻片标本的观测：先在干燥物镜下观察肝小叶的概况，辨认肝细胞；然后用油镜仔细观察肝细胞的显微结构。注意肝细胞的形状，细胞核和核仁的形状和数量，细胞核和细胞质染色的区别等。最后选择完整典型的细胞测量其细胞的大小和细胞核的大小。

2. 洋葱(*Allium cepa*)根尖的细胞铁矾苏木精(I. H)染色玻片标本的观测：先在低倍和高倍物镜下观察根尖纵切面的概况，区分生长点、伸长区和成熟区，然后用油镜仔细观察根尖的细胞的显微结构。注意细胞的形状，细胞核、核仁、液泡和细胞质的形状。最后选择完好典型的根尖细胞进行显微测量。

3. 原核细胞——念珠藻(*Nostoc communae*)细胞玻片标本的示范观察：念珠藻是由球形细胞粘成长链的丝状体，在丝状体细胞中，某些部位能看到比较大的透明的异形细胞，这些细胞具有固氮能力，并能由此处使丝状体断裂。由于念珠藻是原核生物，所以在油镜下看不到细胞核。

四、作业

1. 简述显微镜使用的一般步骤，特别注意油镜的作用。

2. 描绘一个兔肝细胞或洋葱根尖细胞,注意细胞和细胞核测量的实际大小。

参考文献

1. 汪德耀,细胞生物学实验指导,人民教育出版社,4-27,1981。
2. 欧林巴斯光学工业株式会社,显微镜及显微镜照相的基本知识,5-15,1988。
3. 黎国潮,AO 显微镜使用手册,华纳科技(亚洲)有限公司,AO 科学仪器部出版,1982。
4. 田中克己(金连缘编译),显微镜的用法,人民教育出版社,104-115,1960。
5. 汪德耀等,细胞生物学实验技术与方法(第一分册),动物显微技术学,厦门大学出版社,133-137,1989。

实验二 相差显微镜的活细胞观察

一、实验原理

普通光学显微镜可以很好地观察到经固定染色的细胞显微结构,但很难观察到活细胞的显微结构。这是因为人的眼睛只在光的波长(颜色)和振幅(亮度)变化时才能观察到被检的物体,而活细胞或未经染色标本多为无色透明,当光波被通过时,其波长和振幅并不发生变化,所以无法辨别。为了观察活细胞的显微结构,就需要使用相差显微镜。由于相差显微镜的特殊装置,它能把活细胞或未经染色的标本中各部分的折射率或厚度的微小差异,产生相位差,然后利用光的衍射和干涉的现象,把相差变成振幅(明暗)之差,使人的肉眼能够辨认出来。其详细的原理及特殊的装置见《细胞生物学实验技术与方法》(第一分册)第二编第六章第二节。

二、实验用品

相差显微镜 镜油 擦镜纸 载玻片 盖玻片 果蝇幼虫唾腺细胞装片 夹竹桃花丝毛细胞 蛙肝细胞装片

三、实验程序

(一)相差显微镜的使用

1. 相差显微镜的装置

取下普通显微镜的聚光器,换上带有环状光栏的转盘聚光器,并将标示孔指“O”(即明视野);取下普通物镜,装上相差物镜。

2. 调焦和调光

用普通低倍镜在明视野中观察,当发现目标后,把观察的目的

物移到视野的中央。观察透明标本时要缩小光阑。当用相差物镜在明视野对好焦点后,换上相应的环状光阑。例如 $10\times$ 相差物镜用 $10\times$ 标示孔的光阑,并充分开大孔径光阑。如用油浸相差物镜,除盖玻片与物镜之间要滴上香柏油(或石蜡油)外,聚光器与载玻片之间也要滴上油。

光源的调节也很重要,必须使视野亮度均匀,最好装上绿色滤光片,因为波长较短的单色光观察活细胞或照相效果好,并能滤掉红光波,以减弱对活细胞的损伤作用。

3. 中心调节(合轴调节)

拔出目镜,插入中心望远镜,用左手固定其外筒,一边眼看望望远镜,一边用右手转动望远镜的内筒使其升降,对准焦点后就能看到环状光阑的亮环和相板的黑环。此时可将望远镜固定,微微转动聚光器两侧的调节钮,使两者完全重合,如图 1-3e。如果亮环和黑环大小不一致,可升降聚光器使之一致,如果升降聚光器仍不能矫正亮环和黑环一致的话,那就是载、盖玻片过厚的缘故(载玻片不超过 1.2mm ;盖玻片不超过 0.17mm),这就要更换载、盖玻片。换用不同物镜要同时更换相对应的环状光阑,并重新合轴。

中心调节后,拔出望远镜,插入目镜,即可进行镜检。

4. 相差物镜的选择

见《细胞生物学实验技术与方法》(第一分册)第二篇第六章第二节。

不过,某种被检物体选用哪种相差物镜好,目前尚不能得出肯定的结论,而且要具备各种相差物镜也有困难。所以,通常具备中等吸收程度的明反差和暗反差即可。

5. 使用注意事项

- (1)要尽量使用明亮的光源,最好选择有照明器的显微镜。
- (2)要确实做到中心调节,使环状光阑的亮环与相板的黑环完