

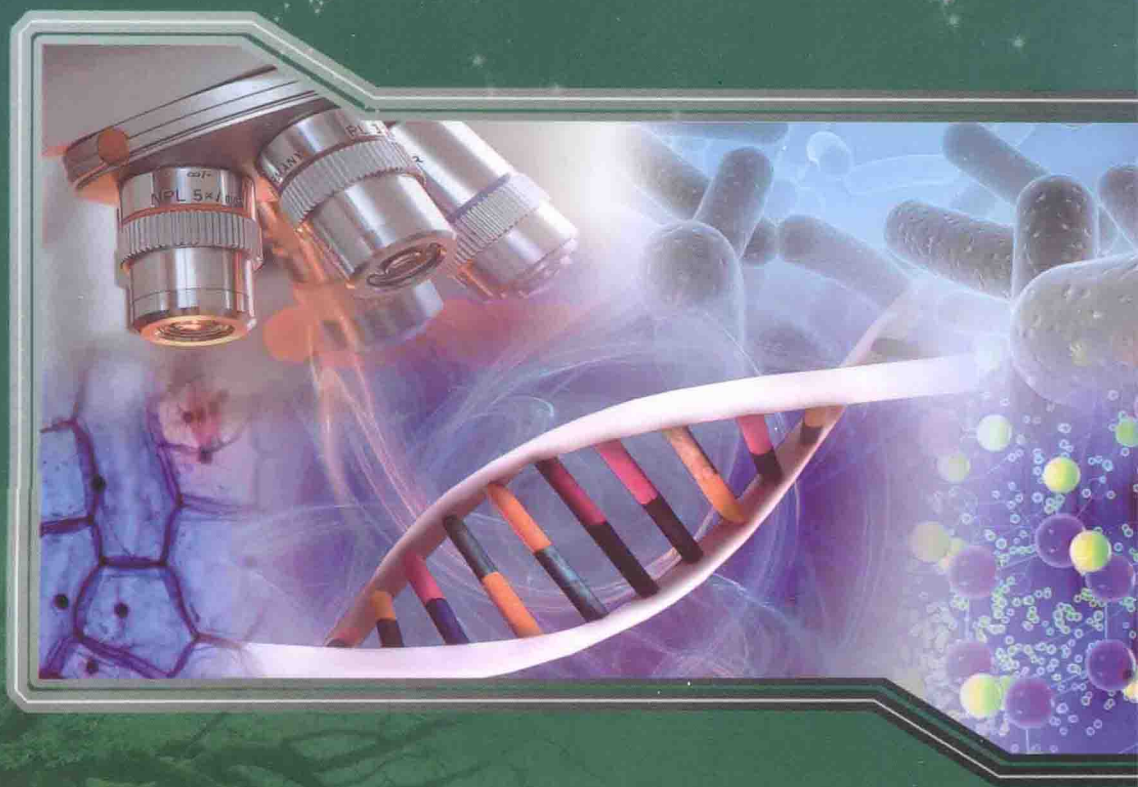
高等医学院校实验系列规划教材

细胞生物学实验与习题指导

XIBAO SHENGWUXUE SHIYAN YU XITI ZHIDAO

主编 鲍明升

第2版



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

细胞生物学实验与习题指导

XIBAO SHENGWUXUE SHIYAN YU XITI ZHIDAO

第2版

主 编 鲍明升

副主编 廖亚平

编 委 (以姓氏笔画为序)

刘长青 李中文 李蕾娜 吴 涛

唐宝定 鲍明升 廖亚平

中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

细胞生物学实验技术在生命基础理论研究及临床医学实践研究中起着极其重要的作用,为适应医学院校(含生物专业)细胞生物学实验教学的需要,特组织力量编写本实验教材,以促进医学院校细胞生物学实验教学,规范实验课程内容。

全书共分两个部分:第一部分为细胞生物学实验教材,共设 15 个实验。所选择的实验内容都是细胞生物学中最基本、最重要的技术或方法,涵盖了目前各高等学校细胞生物学实验教学中所涉及的基本实验和核心技术。第二部分为医学细胞生物学章节习题及答案,目的是帮助学生进一步理解课堂内容和复习所学知识,以及方便学生检查所学内容。

本书主要面向高等医学院校生物科学或生物技术专业 and 临床医学、检验、护理、影像、预防等本科专业细胞生物学和医学细胞生物学实验教学,以及医学细胞生物学课程辅导,也可作为相关实验人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验与习题指导/鲍明升主编. —2 版. —合肥:中国科学技术大学出版社,2015. 4

ISBN 978-7-312-03690-3

I. 细… II. 鲍… III. 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(2015)第 045168 号

出版 中国科学技术大学出版社

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

<http://press.ustc.edu.cn>

印刷 安徽省瑞隆印务有限公司

发行 中国科学技术大学出版社

经销 全国新华书店

开本 710 mm×960 mm 1/16

印张 10

字数 190 千

版次 2011 年 8 月第 1 版 2015 年 4 月第 2 版

印次 2015 年 4 月第 3 次印刷

印数 10001—15000 册

定价 22.00 元

前 言

1925年,生物学大师 E. B. Wilson 就说过:“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找。”细胞生物学是现代生物学的重要基础学科,是生物学各学科在细胞水平的统一;同时,细胞生物学又是一门实验性较强的学科,细胞生物学实验技术在生命基础理论研究及临床医学实践研究中起着极其重要的作用。细胞生物学实验课程对培养学生的基本技能、动手能力、团队合作意识以及综合科研素质等都具有重要意义。近年来,全国不少高等医学院校开设了生物专业,传统的医学细胞生物学实验教材不能满足医学院校生物专业细胞生物学实验教学需要,综合性大学生物专业的细胞生物学实验教材又不能很好适应医学院校细胞生物学实验教学的实际。为此,我们组织力量为医学院校学生(包括生物专业)编写一本细胞生物学实验教材,意在促进医学院校细胞生物学实验教学,规范实验课程内容。

本实验教材的编写理念是:以培养学生掌握细胞生物学基本实验技术为重点,兼顾科学性和先进性。在实验内容的选择上既有较为经典的基础性实验,又有反映现代细胞生物学研究前沿的综合性实验。本实验教材的编写者都是从事细胞生物学理论和实验教学多年的教师,有着丰富的实验教学经验。

从多年的教学实践看,细胞生物学,特别是医学细胞生物学,大多在大一第一学期开设,很多学生上完理论课后,

向老师反映抓不住重点,最好每章能配备一定量的习题,以帮助他们理解课堂内容和及时复习。为此,在本实验教材第二部分,我们结合课堂重点和难点内容,编写章节习题,同时附有一套课程模拟试卷,并且附有习题答案,以方便学生检查课堂知识掌握程度和复习使用。

本实验教材适用于医学院校生物专业的细胞生物学实验教学和医学院校非生物专业(如临床医学、医学检验、预防、影像等)开设的医学细胞生物学实验教学和理论复习。

本教材2011年8月由中国科学技术大学出版社正式出版,2012年12月重印,本次修订再版,既保留了原教材的内容与风格,又对原书中的个别错漏进行了更正,使之更加适应教学需要。

最后,我们要感谢蚌埠医学院生物科学系赵莉教授、陈昌杰教授对本教材编写工作的大力支持和指导,同时非常感谢中国科学技术大学出版社为本书第2版出版给予的帮助。

由于编写者水平有限,加之编写时间仓促,对本实验教材存在的缺点和错误,敬请同行专家和广大读者批评指正。

作者

2014年12月

目 录

前言	(I)
绪论	(1)
第一部分 细胞生物学实验	
实验一 普通光学显微镜的结构及其使用	(3)
实验二 特殊显微镜构造及其使用	(10)
实验三 差速离心法分离细胞器及鉴定	(19)
实验四 细胞中 DNA 与 RNA 的显示与观察	(23)
实验五 细胞活体染色与细胞器的观察	(25)
实验六 微管的间接免疫荧光显示与观察	(28)
实验七 细胞的吞噬活动观察	(30)
实验八 细胞的有丝分裂与减数分裂观察	(33)
实验九 培养器皿的清洗和消毒	(38)
实验十 细胞培养试剂用液的配制与消毒	(45)
实验十一 细胞的原代培养	(48)
实验十二 细胞冻存和复苏	(52)
实验十三 细胞传代培养	(55)
实验十四 培养细胞的形态观察、计数和活力检测	(58)
实验十五 聚乙二醇(PEG)介导的细胞融合	(63)

第二部分 《医学细胞生物学》章节习题及答案

第一章 绪论	(67)
参考答案	(69)
第二章 细胞概念与分子基础	(71)
参考答案	(74)
第三章 细胞生物学研究方法(略)	(77)
第四章 细胞膜与物质的跨膜转运	(77)

参考答案	(81)
第五章 细胞的内膜系统与囊泡运输	(85)
参考答案	(88)
第六章 线粒体及细胞内的能量转换	(93)
参考答案	(96)
第七章 细胞骨架与细胞运动	(100)
参考答案	(102)
第八章 细胞核	(106)
参考答案	(112)
第九章 基因信息的传递与蛋白质合成(略)	(117)
第十章 细胞连接与细胞黏连	(117)
参考答案	(118)
第十一章 细胞外基质及其与细胞的相互作用(略)	(121)
第十二章 细胞的信号转导	(121)
参考答案	(124)
第十三章 细胞分裂与细胞周期	(127)
参考答案	(132)
第十四章 细胞分化与干细胞	(135)
参考答案	(137)
第十五章 细胞衰老与细胞死亡	(140)
参考答案	(142)
第十六章 细胞工程(略)	(145)
医学细胞生物学模拟试卷	(145)
参考答案	(150)

绪 论

一、实验室规则

为获得较好的实验效果,避免发生差错与意外事故,特制定以下规则与要求,希望实验者能严格遵守。

(1) 学生应按规定的上课时间提前 5~10 分钟进入实验室。做好实验前的准备工作,穿白大褂,备好铅笔和实验报告本等。

(2) 在实验室内要遵守实验纪律,严禁谈笑喧闹,保持良好的实验秩序。在实验过程中不得擅自离开实验室,有事向老师请假,获得批准后方可离去。

(3) 实验室内的一切仪器、物品必须爱护。公用物品不得独自占用,用后归还原处。

(4) 注意安全。使用有毒物品、强酸、强碱等,应严格按照操作规程。易燃物品应远离火源。禁止用湿手接触电源开关或电源。

(5) 实验结束,在离开实验室前,应清理好自己的实验台;整个实验室卫生由本班班长安排同学轮流打扫。关好门、窗、水、电后方可离开实验室。

二、实验课学生守则

(1) 应在实验课前预习相关理论和实验教学项目,了解实验的内容、目的和方法。

(2) 着工作服、持学生证准时进入实验室,按指定位置入座,不得无故迟到、早退;不得随意走动、大声喧哗。

(3) 应听从教师指导,严格按实验规定的方法和程序进行操作。涉及危险

物品,应注意安全,如有疑问及时请示教师。客观书写实验报告并按时交教师批改。

(4) 要节约实验资源,爱护公共财产,如有损坏按规定赔偿。

(5) 实验结束时在实验室教师和技术人员指导下,核查实验物品和仪器设备,认真做好实验的“三废”(废气、废液、废渣)及病菌实验动物的处理工作。

(6) 要讲文明、讲卫生,不准随地吐痰、乱扔杂物、乱涂乱画,保持实验室整洁。

(7) 尊敬师长,热爱劳动,负责实验室的卫生整洁工作。实验结束,在得到教师同意后方可离开。

三、细胞生物学实验绘图方法与要求

(1) 细胞生物学实验绘图的原则:真实性和典型性。绘图必须是真实观察到的,不得抄袭教材上附图,要在仔细观察的基础上,选择典型结构进行描绘。所谓典型就是指所绘的图能表达该图所代表的基本特征,通过所绘的图能对结构或内容的基本特点有所表现。

(2) 细胞生物学实验绘图首先要根据实验报告纸空白处的大小做到比例大小适中、布局合理和整齐美观。

(3) 绘图基本顺序:先认真观察标本,然后用铅笔(最好为 HB)轻轻画出各部分的结构轮廓,最后与标本比较其形态、大小比例,各部分的位置关系是否正确,经修改确定后,再用铅笔按先前轮廓图描绘出正式图。

(4) 图的明暗一般用细圆点的疏密来表示,不得涂暗影或进行其他美术加工。

(5) 图中各部结构名称一般在右侧引出不交叉直线,末端平行、对齐,在末端处注明。

(6) 一般在所绘图的下方还要注明该图的名称、染色方法和放大倍数。

第一部分 细胞生物学实验

实验一 普通光学显微镜的结构及其使用

【实验目的】

- (1) 熟悉普通光学显微镜的主要构造及其性能。
- (2) 掌握低倍镜和高倍镜的正规使用方法。
- (3) 了解油镜的使用方法。

【实验原理】

1. 折射和折射率

光线在均匀的各向同性介质中,两点之间以直线传播,当通过不同密度介质的透明物体时,则发生折射现象,这是由于光在不同介质中传播速度不同所造成的。

2. 凸透镜的五种成像规律

(1) 当物体位于透镜物方二倍焦距以外时,则在像方二倍焦距以内、焦点以外形成缩小的倒立实像。

(2) 当物体位于透镜物方二倍焦距上时,则在像方二倍焦距上形成同样大小的倒立实像。

(3) 当物体位于透镜物方二倍焦距以内,焦点以外时,则在像方二倍焦距以外形成放大的倒立实像。

(4) 当物体位于透镜物方焦点上时,则像方不能成像。

(5) 当物体位于透镜物方焦点以内时,则像方也无像的形成,而在透镜物方的同侧比物体远的位置形成放大的直立虚像。

3. 成像原理

显微镜和放大镜起着同样的作用,就是把近处的微小物体形成一放大的

像,以供人眼观察。只是显微镜比放大镜具有更高的放大率而已。物体位于物镜前方,离开物镜的距离大于物镜的一倍焦距,但小于两倍物镜焦距,经物镜以后,必然形成一个倒立的放大的实像 $A'B'$ 。 $A'B'$ 靠近 f_2 的位置。再经目镜放大为虚像 $A''B''$ 后供眼睛观察。目镜的作用与放大镜一样。所不同的只是眼睛通过目镜所看到的不是物体本身,而是物体被物镜形成的已经放大了一次的像(图 1-1)。

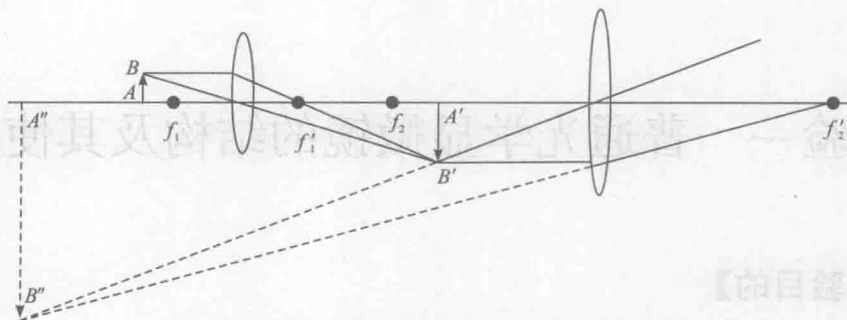


图 1-1 显微镜成像光路图

【器材与材料】

1. 器材

光学显微镜、字母片。

2. 材料

洋葱表皮细胞装片。

【实验步骤】

一、光学显微镜的主要构造

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 1-2)。

(一) 机械部分

1. 镜座

镜座是整个显微镜的基座。通常为马蹄形或长方形,用以支持整个镜体的平稳。有的显微镜在镜座内装有照明装置。

2. 镜柱

镜柱是镜座上方直立的部分,用以连接和支持镜臂。

3. 镜臂

镜臂是镜柱向上的弯曲部分,取用显微镜时握持的地方有的显微镜在镜臂与镜柱之间有一活动关节,称为倾斜关节。可使镜筒向后倾斜,便于观察。



图 1-2 普通光学显微镜结构图

4. 镜筒

镜筒是连在镜臂前方的圆筒,一般筒长为 160 mm。有的镜筒是固定不动的,有的可上下移动,在镜筒上端装有目镜,下端连接物镜转换器。

5. 调节器

调节器是装在镜臂或镜柱上的大小两种螺旋,转动时可使镜筒或载物台上、下移动,以调节物镜和标本之间的距离,即调节焦距。粗调螺旋转动时上下移动范围较大,能迅速调节物镜与标本的距离,使物像呈现于视野中。细调螺旋转动时升降幅度小。一般在用粗调螺旋调焦的基础上或在使用高倍镜时,用它作比较精确的调节,从而得到完全清晰的物像,并能观察标本不同层次和不同深度的结构。

6. 物镜转换器(旋转盘)

物镜转换器是连接在镜筒下端可自由旋转的圆盘,具有 3~4 个圆孔,物镜即装在这些圆孔里,转动旋转盘可调换不同放大倍率的物镜。

7. 载物台

载物台是安装在镜筒下方的方形或圆形平台,用以放置玻片标本。平台中央有一圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。载物台上装有标

本片推进器,其左侧弯形的弹簧夹是用来固定标本片的,转动右侧两个螺旋能向前后左右移动标本。有的推进器上还有刻度,可以计算标本移动的距离和确定标本的位置。

(二) 照明部分

在载物台下方装有一套照明装置,由聚光器、虹彩光圈和反光镜三者组成:

1. 反光镜

反光镜是一个一面平另一面凹的双面镜,装在镜座基部,可向任意方向转动。其作用是改变光源的方向反射到聚光镜上,再经通光孔照明标本。反光镜的凹面聚光力强,适于光线较弱时使用,在光线较强时,宜用平面镜。

2. 聚光器

聚光器位于载物台下方的支架上,由聚光镜和虹彩光圈组成。利用镜台下方的调节螺旋可控制其升降,以调节光线的强弱。

(1) 聚光镜。一般由两个或三个透镜构成,其作用相当于一个凸透镜,具有汇集光线成束以增强照明度的功能。

(2) 虹彩光圈。位于聚光镜下方,也叫光圈,有十几张金属薄片组成。其外侧伸出一柄。推动此柄可改变光阑孔径的大小,以调节通光量。有些显微镜的虹彩光阑下还装有滤光玻片支持框,可安放不同颜色的滤光玻片。

(三) 光学部分

1. 目镜

目镜又称接目镜,装在镜筒的上端,通常由两个透镜组成。在上下透镜之间或在下透镜的下面装有一个用金属制成的光阑,由它决定视野的大小,故称现场光阑。在光阑的面上还可安装目镜测微尺和用人发粘贴在光阑上作为指针,用以指示观察目标。一架显微镜常备有 2~3 个目镜,上面刻有 5×、10×、15× 等符号以示其放大倍数,可供选择使用,一般常用的目镜倍数为 10×。

2. 物镜

物镜又称接物镜,装在物镜转换器上,一般有 3~4 个。物镜是由数片凸透镜和凹透镜严格组合起来的一组镜片,它是决定显微镜分辨性能高低的关键部件。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 100/1.25),镜筒长度和所要求的盖玻片厚度(如 160/0.17)。根据放大倍数不同,习惯上把 10 倍以下的叫低倍镜,把 40 倍的叫高倍镜,把 90 或 100 倍的油浸物镜叫油镜。为便于区别,在高倍镜和油镜上常用一圈不同颜色的线作为特殊标志。

显微镜性能和质量的高低可通过分辨率、数值孔径、放大率及焦点深度、视场直径等指标来反映。

分辨率(resolving power)即显微镜的分辨本领,是指显微镜或人眼在25 cm和明视距离(能看清物像的最佳标准距离)处所能清楚分辨被检物体最小间隔的能力。它主要由物镜的分辨率所决定而与目镜无关。具体公式如下:

$$\text{分辨率 } R = 0.61 \lambda / (N \cdot A)$$

其中 λ 为照明光源的波长,如白光 $\lambda \approx 0.5 \mu\text{m}$; N 为介质的折射率,如空气=1,玻璃=1.52,香柏油=1.51,石蜡油=1.46; α 为镜口角,它是指在工作距离处位于物镜光轴上标本中的一个点所发出的光线到物镜的前透镜有效直径两端所形成的夹角(图1-2)。可见通过降低波长、增大介质折射率和加大孔径角及增加明暗反差是提高分辨率的有效手段。

数值孔径(numerical aperture)也称镜口率,是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数,其公式为:

$$N \cdot A = n \cdot \sin \alpha / 2$$

其中镜口率数字越大,表示分辨力越高。

工作距离是指显微镜处于工作状态(物像调节清晰)时,物镜最下面透镜的表面与盖玻片上表面之间的距离。物镜的放大倍数愈大,工作距离愈小。见表1-1。

表1-1 标准物镜的性质

放大倍数	镜口率($N \cdot A$)	工作距离(mm)
10×	0.20	6.5
20×	0.50	2.0
40×	0.65	0.60
100×	1.25	0.20

二、显微镜的使用方法

显微镜在使用前,应先检查一下它的各个部件是否完整和正常,并进行必要的清洁工作,然后将显微镜放置在自己左肩前方的实验台上,离桌子边缘6 cm为宜,以便观察。

(一) 低倍镜的使用方法

1. 对光

用左手转动粗调螺旋使镜筒上升或载物台下降,然后转动物镜转换器使低

倍镜对准载物台的通光孔,打开光圈,旋转聚光镜升降螺旋,使聚光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度,两眼同时睁开,同时调节反光镜方向,直到视野内的光线均匀,亮度适中为止。

2. 放置玻片标本

取一张玻片标本放在载物台上,有盖玻片的一面朝上,固定在推进器上,然后用手转动推进器螺旋,把要观察的标本部位对准通光孔的中心。

3. 调节焦距

用手转动粗调螺旋,使低倍镜距玻片标本 $<6\text{ mm}$ (调节时必须从侧面注视物镜与玻片的距离,切勿用眼在目镜上观察的同时就转动粗调螺旋,以防镜头碰撞玻片造成损坏,然后两眼同时睁开,用手慢慢转动粗调螺旋,使镜头上升或使载物台下降,当视野中出现物像时,再调节细调螺旋,直至视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可上下左右移动玻片标本位置(注意:玻片移动方向与观察物像移动的方向相反)。如果在调节焦距时,镜头和标本片的距离已超过工作距离而未见物像,则应严格按上述步骤重新操作。

(二) 高倍镜的使用方法

(1) 一定要先在低倍镜下找到待观察的标本物像后,再把需要放大的部分移至视野正中,并把物像调节到最清晰的程度。

(2) 转动物镜转换器直接转换高倍物镜即可见到视野中有不太清晰的物像,此时只要再慢慢向上或向下转动细调螺旋,即可得到清晰的物像。如果发生高倍镜头碰到玻片不能转换时,应检查原因(如低倍镜的焦距是否调好,标本片是否放反或物镜是否松动等),再重新操作。

(三) 油镜的使用方法

(1) 在高倍镜下找到所要观察的标本后将需要进一步放大的部分移至视野中心。

(2) 把聚光器上升到最高位置,光阑开到最大。

(3) 转动物镜转换器。移开高倍镜,在要观察的部位的盖玻片上滴加一滴香柏油作为介质(因香柏油的折射率和玻璃的折射率大致相同)。

(4) 转动物镜转换器使油镜对准通光孔,这时油镜与油滴接触。

(5) 用眼观察目镜,同时小心地转动细调螺旋使镜头微微上升或下降载物台,直到出现清晰的物像。切忌使用粗调螺旋,或在视野中看不到模糊的像时,一直单方向转动细调螺旋使镜头下降,这样会压碎玻片标本或损坏镜头。

(6) 油镜使用完毕,必须把镜头和玻片标本上的香柏油擦净。先用拭镜纸蘸少许二甲苯将镜头上的大部分油去掉,再用干拭镜纸擦拭。擦拭时要顺镜头

的直径方向,不要沿镜头的圆周擦。

【注意事项】

(1) 拿显微镜时,要一手紧握镜臂,一手托住镜座,不要单手提拿,以防目镜或其他零件滑落。

(2) 显微镜不可放置在实验台边缘,以免碰翻落地。

(3) 不要随意取下目镜或拆卸显微镜的各种部件,以防灰尘落入内部或发生丢失损坏等意外事故。

(4) 使用显微镜时,操作要正规,养成两眼同睁、两手并用的习惯,边观察边计数和绘图等。

(5) 要保持显微镜的清洁,发现有灰尘或操作中不慎使镜头和载物台沾上染料、水滴等,应及时擦去。光学和照明部分的镜面只能用擦镜纸轻轻擦拭,切勿用手指、手帕和绸布等擦摸,以免磨损镜面。机械部分可以用布擦拭。

(6) 显微镜使用完毕,转动粗调螺旋上升镜筒或下降载物台,取下标本片,转动转换器使物镜离开通光孔,然后再下降镜筒或上升载物台使接近物镜,垂直反光镜,下降聚光器。关闭虹彩光阑,复原倾斜关节和报片器位置,最后填写使用登记,把显微镜放回镜箱。

【观察与结果】

要求按照显微镜的正规使用方法和注意事项,用所备标本反复练习各操作步骤。

思 考 题

1. 在调焦操作时,为什么低倍镜要先调到距标本片表面 $<6\text{ mm}$ 处,油镜一定要贴近标本片表面?如果把标本片放反了,将会出现什么问题?为什么?

2. 在低倍镜调节焦距时。当视野中出现了能随标本片移动而移动的颗粒或斑纹。是否只要调节推进器将标本对准物镜中央,就一定能观察到标本的物像?为什么?

3. 你如何分析判断视野中所见到的污物点是在目镜上?

4. 使用显微镜观察标本,为什么一定要从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?

5. 在转动细调螺旋时,如已达极限转不动时,你应如何解决?

实验二 特殊显微镜构造及其使用

A 相差显微镜

【实验目的】

掌握相差显微镜的原理、构造及其使用方法。

【器材与材料】

1. 器材

普通复式显微镜、相差显微镜附件、相差物镜、转盘聚光器、合轴调中望远镜和绿色滤色镜、载片、盖片、滤纸。

2. 材料

活体生物样品等。

【实验原理】

光波有振幅(亮度)、波长(颜色)及相位(指在某一时间上光的波动所能达到的位置)的不同。当光通过物体时,如波长和振幅发生变化,人们的眼睛才能观察到,这就是普通显微镜下能够观察到染色标本的道理。而活细胞和未经染色的生物标本,因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位有变化(相位发生的差异即相差),而这种微小的变化,人眼是无法加以鉴别的,故在普通显微镜下难以观察到。相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位,并且利用光的衍射和干涉现象,把相差变成振幅差(明暗差),同时它还吸收部分直射光线,以增大其明暗的反差。因此可用以观察活细胞或未染色标本。

1. 装置

相差显微镜不同于普通光学显微镜,在装置上有四种必不可缺的部件:相差物镜、具有环状光阑的转盘聚光器、合轴调中望远镜和绿色滤色镜。

(1) 相差物镜(phase contrast objective)。相差物镜是显微镜特有的重要装置。在相差物镜内的后焦面上装有种类不同的相板。相板由于前述的作用,