

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

医学细胞生物学实验指导

主编 党洁 钟慧军



科学出版社

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

医学细胞生物学实验指导

主 编 党 洁 钟慧军
副 主 编 焦海燕 陆 宏
编 者 (按姓氏拼音排序)
 陈 静 党 洁 霍正浩
 焦海燕 陆 宏 钟慧军
 朱永生

科 学 出 版 社

· 版权所有 侵权必究 ·

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

内 容 简 介

为促进医学细胞生物学的理论教学,我们在多年的实验教学的基础上编纂了本教材。全书共分两篇。第一篇为实验,包括基础性实验和选择性实验两部分。本书所选的实验内容简单精练,易于操作,是细胞生物学研究领域常用的经典实验。第二篇为强化训练,我们编写了十三章习题,便于学生对理论知识进行复习巩固。

本书可供医学院校本科各专业学生使用,研究生及从事相关专业研究人员可供参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验指导 / 党洁,钟慧军主编. —北京:科学出版社,2013
国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-037457-8

I. 医… II. ①党… ②钟… III. 医学-细胞生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 096566 号

责任编辑:王 颖 李国红 / 责任校对:包志虹

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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 5 月第一次印刷 印张:7 插页: 2

字数:160 000

定价:19.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

医学细胞生物学是生命科学领域的前沿学科,也是医学的重要基础学科。同时,医学细胞生物学也是一门实验性较强的学科,从它的诞生、发展以及未来的进展都离不开实验技术的支撑;医学细胞生物学实验技术也广泛应用于医学理论研究及临床实践研究;目前,医学领域面临的许多重大问题,最终解决也要依赖于细胞生物学研究的不断发展。因此,学习和掌握医学细胞生物学实验技术,对于医务工作者和医学生来说也是非常必要的。

本书共分两篇。第一篇为实验部分,分为两章,第一章基础性实验,包括八个实验,安排了显微镜技术、细胞结构与成分的显示技术、细胞生理等内容,力求做到理论与实践相结合,帮助学生在短时间内掌握细胞生物学基本实验技能。第二章选择性实验,包括五个实验,安排了细胞培养技术以及染色体技术等内容,希望能够培养学生独立思考和动手能力,为后续课程打好基础。第二篇为强化训练及参考答案,我们根据医学细胞生物学教学大纲和教学进度按章节编写了相关习题及参考答案,共十三章,用以帮助学生在课余时间对医学细胞生物学理论知识进行复习和巩固。

本书主要适用于医学院校本科各专业学生,对研究生及其他分支学科的师生们也有一定的参考价值。本书的特点是简洁、实用、针对性强,有助于加强基础理论与医学实践的联系,并对培养学生的动手能力,掌握基本的操作技能有一定帮助。并附有医学细胞生物学习题,可以帮助学生进一步对理论学习进行检验。

虽然我们已经对书稿进行了精心的修改,但由于编写人员知识水平和写作能力有限,本教材难免出现不足,希望使用本教材的老师和同学提出宝贵意见,以便再版时改正。

党 洁 钟慧军

2012年6月

目 录

绪论	(1)
----------	-----

第一篇 实验部分

第一章 基础性实验	(3)
实验一 光学显微镜的结构和使用	(3)
实验二 动物细胞基本形态和结构的观察	(6)
实验三 细胞化学	(8)
实验四 细胞膜的生理	(10)
实验五 细胞计数	(12)
实验六 细胞骨架及细胞器的观察	(14)
实验七 细胞的有丝分裂	(16)
实验八 减数分裂	(18)
第二章 选择性实验	(22)
实验九 人类外周血淋巴细胞的培养	(22)
实验十 人类外周血淋巴细胞染色体标本的制备	(23)
实验十一 正常人染色体的形态及核型分析	(24)
实验十二 细胞的原代培养和传代培养	(25)
实验十三 培养细胞的冻存与复苏	(32)

第二篇 强化训练及参考答案

第一章 细胞生物学概论	(34)
第二章 细胞生物学研究方法	(38)
第三章 细胞的分子基础	(43)
第四章 细胞膜和细胞表面	(47)
第五章 细胞信号转导	(55)
第六章 细胞连接与细胞外基质	(60)
第七章 内膜系统和核糖体	(64)
第八章 线粒体	(72)
第九章 细胞骨架	(77)
第十章 细胞核	(83)
第十一章 细胞周期	(91)
第十二章 细胞分化	(98)
第十三章 细胞衰老与细胞凋亡	(102)
参考文献	(105)
彩图	

良好的实验秩序;穿好实验服,书籍物品要放置整齐。实验前要认真检查所用仪器、药品等是否完好、齐全,如有缺损,应及时向老师报告,予以调整补齐。未经老师宣布,不得擅自进行操作。注意保持室内整洁,不准乱丢污物,严禁吸烟。实验用过的器材要清洗干净,仪器要按规定擦拭,做到整洁。

3. 严格操作 实验时,应按照实验指导,认真操作,仔细观察,做好实验记录,以加深理解和记忆,培养分析问题和解决问题的能力,认真完成实验报告。

4. 爱护标本、器材和仪器设备 对显微镜等贵重精密仪器,应按操作规程操作、精心保管。如有损坏,应及时报告、主动登记,严格遵守损坏赔偿制度。节约实验材料、药品试剂、水电,杜绝浪费现象。

5. 保持实验室清洁卫生 实验结束后,应将实验仪器、用品等物放置整齐,桌面收拾干净,待实验总结完毕后方可离开实验室。值日生要认真做好室内清洁卫生。

(党 洁)

第一篇 实验部分

第一章 基础性实验

实验一 光学显微镜的结构和使用

【课前准备】

- (1) 了解医学细胞生物学实验室规则及相关要求。
- (2) 了解光学显微镜的重要性。
- (3) 了解光学显微镜的基本工作原理。

【目的和要求】

- (1) 熟悉光学显微镜各部分的结构及功能。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。

【材料和用品】

普通光学显微镜 (microscope)、擦镜纸 (lens paper)、香柏油 (cedar wood oil)、二甲苯 (dimethylbenzene)、文字片、人血涂片。

【内容和方法】

光学显微镜是观察微观世界的重要工具,没有它就无法打开微观世界的大门。光学显微镜不仅可以用来观察细胞基本形态和一些内部结构,同时还可以通过与其他技术的结合,进行细胞化学成分的定位、定性等功能方面的研究,是基础医学和临床医学研究中用途最广的仪器之一。学习和掌握普通光学显微镜的结构功能和操作方法,是医学及相关领域专业学生必须掌握的基本技能之一。

1. 普通光学显微镜的结构 光学显微镜一般由机械部分、照明部分和光学放大部分组成(图 1-1)。

(1) 机械部分

1) 镜座(base):为显微镜最下面部分,一般为马蹄形,用以稳定和支持整个显微镜。电光源显微镜一般在镜座内装有照明电源等构造。

2) 镜柱(pillar):为联系镜座与镜臂之间的部分。

3) 调节器(regulator):位于镜柱下方两

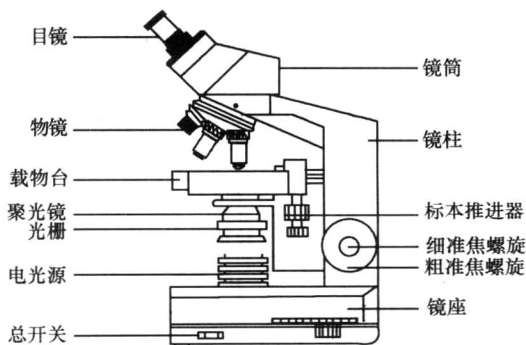


图 1-1 光学显微镜结构示意图

侧,为一组组合旋钮,能用来调节焦距。外侧大旋钮为粗准焦螺旋,转动时可使镜筒作较大距离的升降,一般用于低倍镜调节焦距。内侧小旋钮为细准焦螺旋,可使镜筒作微小距离的升降,用于高倍镜、油镜调节焦距。

4) 镜臂(arm):为弓形部分,位于镜柱上方,用以支持镜筒和镜台。在搬运显微镜的过程中,需手握镜臂。

5) 镜台/载物台(stage):位于镜臂中端的方平台,为放置玻片或标本用。镜台中心有一个孔洞,可使光线通过,称为通光孔。台上有标尺和压片夹,用以定位和固定玻片标本。在载物台一侧一般装有标本推进器,为一组组合旋钮,通过转动旋钮可使玻片前后、左右移动。

6) 镜筒(light tube):位于镜臂的前方,上端装有目镜,下端装有物镜转换器。根据镜筒的数目,光镜一般可分为单筒式和双筒式,目前较常用的是双筒式电光源显微镜。

7) 物镜转换器(nosepiece):镜筒下端的圆盘状结构,其下面可连接3~4个不同放大倍数的物镜,旋转时可更换不同物镜。

(2) 照明部分

1) 电光源(electric light source):位于镜座正中,一般在镜座一侧装有电光源总开关,有的显微镜电光源总开关也是调节光线强弱的调节器,通过旋转旋钮用于打开光源并调节光线强弱;一般显微镜的电光源总开关与调节光线强弱的调节器是分开的,可分别操作。

2) 聚光镜(condenser):位于载物台下方,由一组透镜组成,可使光线聚集在标本上。一般在其一侧装有一个旋钮,称为聚光镜升降器。旋转该旋钮可使聚光镜上下移动,用于调节光线强弱。

3) 光栅(aperture):位于聚光镜下方,由一组活动金属片组成,构成一个可开关的孔。在其外侧有一个小柄,可以调节控制光线通过的大小。在光栅下方一般还装有滤光片。

(3) 光学放大部分

1) 目镜(eyepieces):每台显微镜通常配有3~4个放大倍数不同的目镜,标有5×、10×、15×等符号,数字越大,放大倍数越高。通常使用的是10×的目镜。

2) 物镜(objectives):普通光学显微镜一般有3个物镜,放大倍数分别为10×(低倍镜)、40×(高倍镜)、100×(油镜),有些显微镜还安装有超低倍镜,放大倍数为4×,一般仅在观察较大标本时使用。在每个物镜上刻有能反映其性能的参数,主要有放大倍数和数值孔径(如10/0.25、40/0.65和100/1.25)、该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度(160/0.17,单位mm)。各种物镜的比较见表1-1。

表 1-1 三种物镜的比较

镜头	镜身	放大倍数	标示线颜色	工作距离(mm)
低倍镜	短	10	黄色	7
高倍镜	较长	40	蓝色	0.5
油镜	长	100	白色	0.2

显微镜放大倍数=目镜放大倍数×物镜放大倍数

如高倍镜放大倍数=10×40(倍)=400倍。

2. 光学显微镜的使用方法

(1) 低倍镜的使用

1) 检查:检查显微镜各部分结构是否完整,如发现有缺损或性能不良时,应立即报告老师,请求处理。

2) 准备:将显微镜放在实验桌上偏左方,镜座与桌边相距 10cm 左右。转动粗准焦螺旋,上升镜筒。转动物镜转换器,使低倍镜对准镜台的圆孔即通光孔。

3) 对光:先检查光栅是否打开,聚光镜是否上升,打开电光源,使光线投入镜筒中,同时调节光源开关,直到整个视野呈青白色的光亮为止。

4) 置片:取被观察的玻片标本置于镜台上,用压片夹固定,注意玻片有标本一面一定要朝上。用标本推进器调节玻片,使片中的标本位于通光孔的正中央,物镜的正下方。

5) 调整工作距离:要在显微镜内清晰地看到标本的物像,必须使标本和物镜之间的距离符合该物镜的工作距离。以江南 JNOEC XS-212-201 型电光源双目显微镜为例,其工作距离在低倍镜为 7.63mm、高倍镜为 0.5mm、油镜为 0.198mm。在操作过程中,先从侧面注视低倍镜,转动粗准焦螺旋,使镜筒徐徐下降到距离玻片 5mm 处为止(注意:不可一边在目镜中观察,一边下降镜头,这样做可能在不知不觉中使镜头压碎标本,甚至可能损坏物镜)。然后用双眼在目镜中观察,同时调节粗准焦螺旋,使镜筒慢慢上升,直到视野中出现标本物像为止。再用细准焦螺旋调节即可得到最清晰的物像。以上过程应在掌握显微镜各部分结构和性能的基础上,结合玻片标本观察,反复练习。

6) 光线调节:一般而言,放大倍数越高,光通量越小;同时,反差较大的标本,需要较强的光线,反差较小的标本,需要较弱的光线。

(2) 高倍镜的使用

1) 依照上述操作步骤,先用低倍镜找到物像。

2) 在低倍镜下将需要观察的标本或标本的一部分移至视野中央。

3) 转动物镜转换器,调换高倍镜。然后微微向上、下转动细准焦螺旋(切记不可用粗准焦螺旋),至物像清晰为止。若光线太强或太弱,可调节光栅或镜座上的电光源总开关,求得最适的亮度。

(3) 油镜的使用

1) 依照上述操作步骤,先用低倍镜或高倍镜找到物像,并将需观察的标本或标本的一部分移至视野中央。

2) 转动物镜转换器移开镜筒,在玻片上需观察的部位滴一滴香柏油,然后转动物镜转换器使油镜到位(此时油镜前端浸在香柏油中)。

3) 从目镜中观察,略微转动细准焦螺旋使镜筒微微升高,直到视野内出现物像为止。如果没有出现物像,应重新调整工作距离,重复低倍镜到高倍镜,再到油镜的操作。找到物像后再利用聚光镜和光栅选择最适合的光线即可观察。

4) 油镜使用完毕后,用擦镜纸沾少许二甲苯或擦镜剂,分别将油镜及玻片上的香柏油擦干净。如果高倍镜在使用过程中也沾染有香柏油,需同时予以擦拭。

(4) 操作练习

1) 文字装片(用于练习低倍镜和高倍镜的使用):取一张文字装片,先用肉眼看清字母,再严格按上述程序,选用低倍镜观察。找到物像,注意移动的方向,物像移动的方向与玻片移动方向是否一致?镜下观察的字母是正像还是反像?在用高倍镜观察之前,先将物

像移向视野中央再转换镜头。反复操作,以求熟练。

2) 人血涂片:在置片时,注意片子的正反,玻片材料上如无盖玻片,用红铅笔标记的一面为正。依次练习高倍镜和油镜的操作。用高倍镜观察,可看到人血涂片中有许多红色、中心染色浅的无核圆盘状球形细胞即红细胞。在红细胞之间分散着数目很少的白细胞,它们一般较红细胞稍微大些,染色稍有区别,细胞内具有多种形态的细胞核。试找一个白细胞,按前面所述的步骤进行油镜的操作。

3. 使用显微镜时应注意的事项

(1) 显微镜是精密仪器,使用时必须严格地按规程进行操作。

(2) 保持显微镜清洁,不用时应及时用镜罩罩好,放回镜箱。机械部分有灰尘可用干净纱布擦拭,光学部分如有污垢切勿用手、纱布和毛巾擦拭,必须用擦镜纸轻擦,如污垢严重,可沾少许二甲苯擦拭。

(3) 在镜检标本时,应睁开双眼。

(4) 临时制片时,应注意将载玻片上、下多余水分擦去,再放置镜台上。

(5) 使用油镜时,必须先在玻片标本滴上镜油才能进行观察,用毕后应立即将油擦净。

(6) 如遇机件不灵,使用困难,切勿随意用力转动,更不可任意拆修,应立即报告指导教师协助排除故障。

(7) 显微镜使用完毕,应取出玻片标本,并将物镜转成八字形偏离镜台通光孔,下降镜筒,使之靠近但不能接触载物台,然后罩上镜罩。

【实验报告】

填图:填注显微镜各部件的结构名称。

【思考题】

(1) 使用显微镜观察标本时为什么必须按照从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?

(2) 如果标本玻片放反了,可用高倍镜或油镜找到标本物像吗?为什么?

(党洁)

实验二 动物细胞基本形态和结构的观察

【课前准备】

(1) 熟悉各种细胞的基本特征。

(2) 熟悉细胞的大小、形态及数量与细胞功能间的关系。

【目的和要求】

(1) 掌握光学显微镜下动物细胞的基本形态结构。

(2) 进一步掌握光学显微镜的使用方法。

(3) 初步掌握生物装片的制作方法。

(4) 掌握绘制生物示意图的基本方法。

【材料和用品】

(1) 光学显微镜、香柏油、擦镜纸。

(2) 兔小脑切片、蟾蜍皮切片、狗动脉切片、蟾蜍红细胞涂片、人类精子涂片。

【内容和方法】

细胞(cell)是生命活动的基本结构和功能单位。构成人体和其他高等动物体的细胞种类繁多、形态各异。细胞形态与其功能往往相适应,如具有收缩功能的肌细胞呈条形或长梭形;运输 O_2 和 CO_2 的人成熟红细胞为双凹圆盘状;具有感受刺激、传导冲动功能的神经细胞一般附有长短不一的树枝状突起;精子细胞具有一根长长的鞭毛以帮助其游动等。

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,如哺乳类动物红细胞成熟时细胞核消失。

组织切片常用的染色方法为 HE 染色法。HE 染色法是最常用染色方法之一,是用苏木精和伊红两种染料进行染色。HE 是苏木精(hematoxylin)和伊红(eosin)的首个字母缩写。苏木精是碱性染料,使细胞核染色质与细胞质内的核糖体呈紫蓝色。伊红是酸性染料,使细胞质和细胞外基质中带较强碱基的蛋白质成分着红色。

1. 兔小脑神经细胞 取兔小脑横切标本(硝酸银染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可见有许多突起的小脑神经细胞;油镜观察下可见胞体被染成黑褐色,形态多样(枣核形、三角形),突起长短不一,有些细胞内可看到被染成棕黄色的、大而圆的细胞核(彩图 1-1)。

2. 蟾蜍上皮细胞 取蟾蜍皮横切片(HE 染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可见蟾蜍上皮是由排列紧密的多边形扁平细胞和多边形柱状细胞组成;油镜下观察可见颜色较浅的细胞外界,细胞核位于细胞的中央,呈圆形,被染成蓝紫色。在上皮细胞下方可见被染成粉红色的结缔组织和肌细胞(彩图 1-2)。

3. 狗平滑肌细胞 取狗动脉切片(HE 染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可以看到许多被染成粉色的平滑肌纤维,平滑肌纤维是梭形的细胞,彼此镶嵌排列,细胞界限不明显,被染成蓝紫色的椭圆形的细胞核位于细胞的一侧(彩图 1-3)。

4. 人精子涂片 取人精子涂片(铁苏木素染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可见许多细小的被染成黑灰色的人成熟精子细胞;高倍镜下观察可见精子细胞呈“蝌蚪形”,每个精子细胞都具有细长的尾丝(彩图 1-4)。

5. 蟾蜍红细胞 取蟾蜍血细胞涂片(HE 染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可见蟾蜍红细胞为椭圆形,呈浅粉红色,细胞核位于中央,圆形或椭圆形,呈蓝紫色,高倍镜下观察隐约可见核仁(彩图 1-5)。

6. 人血涂片 取人血涂片置于显微镜下,低倍镜下观察可见许多细小的圆形细胞,高倍镜可见成熟红细胞呈双凹圆盘状,无细胞核;白细胞形态各异,有核,注意观察细胞核的不同(彩图 1-6)。

【实验报告】

按绘图要求,绘制兔小脑神经细胞图、蟾蜍红细胞图、人精子细胞图。

【思考题】

举例说明细胞形态与功能的关系。

(党 洁)

实验三 细胞化学

【课前准备】

- (1) 复习细胞分子基础(如蛋白质、核酸等)的相关理论知识。
- (2) 了解细胞化学实验的基本原理。
- (3) 绘制细胞化学实验的简易流程图。

【目的和要求】

- (1) 熟悉细胞的某些化学成分在细胞内分布情况。
- (2) 了解几种细胞化学呈色反应的一般原理和方法。

【材料和用品】

- (1) 显微镜、剪刀、镊子、染色盘或染色缸、恒温水浴箱、载玻片、吸管、吸水纸、酒精缸。
- (2) 95% 乙醇、甲基绿-派洛宁混合液、0.1% 酸性固绿、0.1% 碱性固绿、5% 三氯乙酸、蟾蜍。

【实验原理】

构成细胞的化学成分包括蛋白质(酶)、核酸、糖类有机物和水、无机盐等无机化合物,其中蛋白质酶、核酸等有机物在细胞生命活动中起着重要作用。

细胞化学是在保持细胞原有结构的基础上,利用某些化学试剂与细胞内的一些化学物质进行反应,使其终产物形成有色沉淀,以达到对细胞中化学成分进行定位和定性研究目的的科学。

本实验是利用化学试剂分别与细胞内酸性蛋白质、碱性蛋白质、DNA、RNA 产生有色的沉淀反应,从而达到对蛋白质、DNA、RNA 进行定性、定位研究的目的。

1. 细胞内酸性蛋白、碱性蛋白显示的原理 蛋白质的基本组成单位是氨基酸,它们同时具有氨基和羧基(在溶液中主要以 NH_4^+ , COO^- 形式存在)。在一定生理条件下,如整个蛋白质所带的负电荷多,就为酸性蛋白;带正电荷多,就为碱性蛋白。细胞内酸性蛋白带有负电荷(COO^-)多,在染色时需要带正离子(H^+)多的酸性染料与之反应,而碱性蛋白带正电荷(NH_4^+)多,染色时需要带负离子(OH^-)多的碱性染料与之反应。据此,可将标本经三氯乙酸处理(除去核酸,消除影响因素),用不同 pH 的固绿染液染色,可使细胞内的酸性蛋白和碱性蛋白分别显示。

2. 细胞内 DNA、RNA 的显示的原理 核酸是生物体最重要的组成成分之一。核酸分为两大类,即脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。它们在细胞内的分布和化学性质均有所不同。DNA 主要分布在间期核的染色质或有丝分裂过程中的染色体, RNA 主要分布在细胞质和核仁内。

细胞经甲基绿-派洛宁混合液处理后,其中的 DNA 和 RNA 出现不同的呈色反应。甲基绿染 DNA 和派洛宁染 RNA 是由于 DNA 和 RNA 聚合程度不同,对碱性染料有不同的亲和力,所以进行选择性的染色。甲基绿分子上有两个相对的正电荷,它对聚合程度高的 DNA 有强的亲和力,故可使分布在细胞核中的 DNA 被染成蓝色或绿色;而派洛宁分子上只有一个相对的正电荷,它仅和聚合程度较低的 RNA 相结合,使分布于细胞质和核仁中的 RNA 染成红色。因此,Brachet 法即甲基绿-派洛宁法可对细胞中的 DNA 分子和 RNA 分子进行定位、

定性和定量分析。

【方法和步骤】

1. 细胞内酸性蛋白、碱性蛋白的显示

(1) 取材和涂片:以破坏脊髓法处理蟾蜍,然后将蟾蜍腹面向上固定在蛙板上,剪开胸腔,暴露心脏,打开心包。将心脏剪开一个小口,用棉签蘸取血液,在干净载玻片上涂抹一层,晾干。在玻片的正面做上记号(注意:棉签蘸取血液不可太多,涂片要轻、快,一次完成,以免血液涂层过厚,影响观察)。

(2) 固定:将晾干的载玻片浸于95%乙醇中固定5分钟,自然风干。

(3) 三氯乙酸处理:将已固定的载玻片浸于60℃的5%三氯乙酸(水浴锅内放置的酒精缸内)中处理30分钟。然后水龙头开小,清水反复冲洗(注意:一定要反复冲洗,不可在片子上留下三氯乙酸痕迹,否则酸性蛋白和碱性蛋白的染色不易区分)。

(4) 染色和镜检:取两张经三氯乙酸处理过的载玻片分别放入0.1%酸性固绿和0.1%碱性固绿染液中,分别染5分钟和15分钟。然后清水冲洗(染液冲掉即可),用吸水纸吸去多余的水分,镜检观察(注意:两张载玻片不可拿混)。

(5) 结果:显微镜下可见经酸性固绿染色的载玻片中的细胞其细胞质和核仁中有酸性蛋白分布而被染成绿色,细胞核未着色(彩图1-7);经碱性固绿染色的载玻片中的细胞只有细胞核被染成绿色,这是碱性蛋白分布的位置(彩图1-8)。

2. 细胞内DNA、RNA的显示(Bracket法即甲基绿-派洛宁法)

(1) 取材和涂片:同上。

(2) 固定:将晾干的载玻片浸于95%乙醇中固定10分钟,晾干。

(3) 染色:滴数滴甲基绿-派洛宁混合染液于载玻片上,染色20分钟,清水冲洗(染液冲掉即可),用吸水纸吸去多余的水分。

(4) 镜检:在高倍镜下仔细观察红细胞的细胞核和细胞质的颜色。细胞核被染成蓝色或绿色;细胞质染成红色,染色较好的情况下,隐约可见核仁中少许红色(彩图1-9)。

【实验报告】

(1) 绘图表示蟾蜍红细胞中酸性蛋白质及碱性蛋白质的分布情况。

(2) 绘图表示蟾蜍红细胞中DNA和RNA的分布情况。

【思考题】

(1) 本实验显示DNA和RNA的原理是什么?

(2) 显示细胞内蛋白质酸碱性质的原理是什么?

附录:试剂配制

1. 5% 三氯乙酸 三氯乙酸 5.0g,蒸馏水 100ml。

2. 0.1% 酸性固绿染液(pH 2.2)

(1) 0.2% 固绿水溶液:固绿 0.2g,蒸馏水 100ml。

(2) 2.0mol/L 盐酸溶液:盐酸(比重 1.19)0.109ml 加蒸馏水至 100ml。

(3) 使用时将以上两种溶液以 1:1 混合即可。

3. 0.1% 碱性固绿染液(pH 8.0~8.5)

(1) 0.05% Na_2CO_3 溶液: Na_2CO_3 0.05g,蒸馏水 100ml。

(2) 0.2% 固绿水溶液与 0.05% Na_2CO_3 溶液 1:1 混合即可。

4. 甲基绿-派洛宁混合染液

(1) 0.2mol/L 乙酸缓冲液 (pH 4.8): 冰乙酸 1.2ml, 加蒸馏水至 100ml 乙酸钠 ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 2.7g, 溶于 100ml 蒸馏水中。使两液按 2:3 比例混合。

(2) 2% 甲基绿染液: 去杂质甲基绿粉 2.2g, 0.2mol/L 乙酸缓冲液 100ml (pH 4.8)。

(3) 1% 派洛宁染液: 派洛宁 (吡罗红) 1.0g, 0.2mol/L 乙酸缓冲液 100ml (pH 4.8)。

(4) 临时时将 2% 甲基绿染液与 1% 派洛宁染液以 5:2 混合即成。

(钟慧军)

实验四 细胞膜的生理

【课前准备】

- (1) 复习关于细胞膜功能的相关理论知识。
- (2) 了解细胞膜通透性的基本原理。
- (3) 绘制实验的简易流程图。

【目的和要求】

- (1) 以蟾蜍为实验对象, 观察蟾蜍咽部上皮细胞纤毛运动。
- (2) 通过对细胞膜通透性实验进行观察, 掌握细胞膜的生理特性。

【材料和用品】

(1) 10% 兔红细胞悬液、0.17mol 氯化钠、0.17mol 氯化铵、0.17mol 硝酸钠、0.12mol 硫酸钠、0.12mol 草酸铵、0.17mol 乙酸铵、0.32mol 葡萄糖、0.32mol 乙醇、0.32mol 丙醇、0.32mol 丙三醇 (甘油)、石蜡屑、生理盐水。

(2) 手术剪刀、手术探针、蛙板、蛙钉、光学显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、吸管、试管、试管架、移液管 (1ml)、橡皮吸球、棉球、吸水纸、记号笔。

(3) 蟾蜍、家兔。

【实验原理】

细胞膜是细胞质和外界相隔的一层薄膜, 是细胞与环境进行物质交换的选择通透性屏障。它是一种半透膜, 可选择性控制物质进出细胞。所以它不仅限定了细胞的范围, 而且使细胞内的物质和外界环境之间保持必要的差别。细胞膜在细胞的生理活动中起着十分重要的作用, 尤其在调节细胞内外物质运输和信号传递等方面起着非常重要的作用。

1. 纤毛运动 纤毛是细胞表面伸出的、能运动的指状突起。人类呼吸系统的呼吸道 (鼻腔、喉、气管和支气管) 黏膜细胞大多数都具有纤毛, 借助纤毛的定向摆动, 可以清除进入呼吸道内的微生物和灰尘颗粒。

本实验可通过蟾蜍的口腔黏膜细胞上的纤毛运动来模拟呼吸道纤毛运动, 并加以观察。这是由于两栖类的口腔与食管黏膜有大量的黏液细胞和纤毛细胞, 并且易于观察。纤毛以每秒数次乃至数十次的频率, 往复进行摆动。

2. 溶血作用与红细胞的通透性实验 各种物质出入细胞的方式是不同的, 水是生物界最普遍的溶剂, 水分子可以按照物质浓度梯度从渗透压低的一侧通过细胞膜向渗透压高的

一侧扩散,这种现象就是渗透。渗透作用是细胞膜的主要功能之一。

将红细胞放在低渗盐溶液中,水分子大量渗到细胞内,可使细胞胀破,血红蛋白释放到介质中,由不透明的红细胞悬液变为红色透明的血红蛋白溶液,这种现象称为溶血。

将红细胞置于各种等渗液中,根据细胞膜对各种溶质选择通透能力的不同,有的溶质分子可透入细胞膜,并使细胞内的盐浓度高于细胞外,产生渗透压,并使细胞膜胀破,产生溶血现象。而有的溶质分子则不能通过细胞膜,红细胞不破裂。

一般来讲,脂溶性分子可通过细胞膜,并且分子量越小通过细胞膜速度越快,如乙醇等有机分子。有些不带电的极性小分子,如水、尿素等,它们的分子量小,并且为双极性分子,因而也能穿过细胞膜。一些亲水性的物质,如葡萄糖、氨基酸和许多无机盐等不易透过细胞膜。所有带电荷的离子,都是高度不通透的,这些离子所带的电荷及高度的水合状态阻碍它们进入脂双层的疏水区域,如 Na^+ 、 K^+ 对脂双层的通透性仅为水的 10^{-9} 倍。能透入细胞膜的溶质分子其透入速度也有差异。因此,发生溶血现象所需时间长短也可作为测量物质进入红细胞速度的一种指标。

【方法和步骤】

1. 纤毛运动

(1) 动物的处理和固定:蟾蜍采用脊柱穿刺法处理。

首先将蟾蜍背部朝上放在左手,用食指与中指夹住蟾蜍前两肢,用无名指与小指夹住后两肢,用拇指在两个大毒腺之间(头与脊柱交界处)按压,可感知有一个凹陷处,即枕骨大孔。然后,右手持解剖探针,刺入枕骨大孔,向下插入约 2mm,然后向上插入小脑,用针搅动破坏其脑,直至上肢僵硬不动为止;然后向下沿脊柱插入椎孔约 2~3mm,用针搅动直至蟾蜍下肢僵硬不动为止。处理后的蟾蜍使其腹面朝上,展开四肢,用蛙针将其四肢和头部固定到蛙板上(图 1-2)。

(2) 实验材料的提取和临时制片:剪开蟾蜍的口角,将下颌翻开暴露口腔咽部,找到喉门。用手指蘸取少许石蜡屑放于蟾蜍喉门及周围,静置 10~15 分钟。事先滴一滴生理盐水于载玻片上,将从蟾蜍喉门附近剪的一小块组织放于载玻片上,盖上盖玻片。

(3) 观察:将制好的片子放于镜下,调暗光圈,低倍镜下寻找和观察。注意,在剪下的组织的边缘容易看到纤毛运动。



图 1-2 蟾蜍脊柱穿刺处理法

2. 溶血作用与红细胞膜的通透性实验

(1) 取一支 10ml 注射器,吸取少量肝素将注射器内壁均匀浸湿,并将多余的肝素推掉,从家兔心脏采集兔血 10ml,用生理盐水制成 10% 的红细胞悬液,用小烧杯分发到各实验小组(以上步骤由教师完成),兔红细胞悬液为一种不透明的红色液体,将一本书放到烧杯的背面,隔着烧杯看不清书上的文字。

(2) 取 11 支试管放入试管架中,统一标线并分别编号,用吸管按顺序分别向 11 支试管中加入已配好的 11 种试剂至所标注的标线位置。注意:试管编号要与下列溶液编号一致,加试剂的滴管切勿混淆弄错,交叉使用,以保证实验结果的准确性。如① H_2O ; ② 0.17mol 氯化钠; ③ 0.17mol 氯化铵; ④ 0.17mol 硝酸钠; ⑤ 0.12mol 硫酸钠; ⑥ 0.12mol 草酸

铵;⑦0.17mol 乙酸铵;⑧0.32mol 葡萄糖;⑨0.32mol 乙醇;⑩0.32mol 丙醇;⑪0.32mol 丙三醇。

(3) 1ml 移液管分别向上述 11 支试管中加入 10% 兔红细胞悬液 0.3ml, 振摇均匀, 注意观察是否发生了红细胞溶血现象。如发生溶血现象, 可隔着试管看清书上的文字, 把溶血时间记录下来。

(4) 将实验结果记录到表 1-2。

表 1-2 溶血时间记录表

试管编号	试剂种类	是否发生溶血现象	溶血时间	结果分析
①				
②				
③				
④				
⑤				
⑥				
⑦				
⑧				
⑨				
⑩				
⑪				

【实验报告】

列表、记录并分析兔红细胞通透性实验结果。

【思考题】

- (1) 细胞表面的一些结构都有什么作用?
- (2) 为什么不同的物质通过细胞膜会有差异, 这与细胞膜的结构有何关系?
- (3) 通过本次实验你如何理解细胞膜是选择性半透膜?

(钟慧军)

实验五 细胞计数

【课前准备】

了解细胞计数的基本方法和步骤。

【目的和要求】

了解血细胞计数板构造, 掌握细胞计数的基本方法。

【材料和用品】

0.17mol/L 氯化钠溶液, 蟾蜍红细胞悬液, 无菌细口吸管, 显微镜, 细胞计数板, 酒精棉球。

【实验原理】

细胞计数就是从需要计数的细胞悬液中取一定量细胞进行计数,并通过计数得知原始细胞悬液中的细胞密度以及细胞总数。在细胞计数时,若细胞浓度太高,可进行必要的稀释。常用的细胞计数有细胞电子计数仪计数法和细胞板计数法,但电子计数仪计数法在许多实验室尚未完全推广,细胞板计数法仍是实验室目前常用的方法。

【方法和步骤】

1. 制备蟾蜍红细胞悬液 取 50ml 小烧杯一只,以一份蟾蜍血加 1000 份 0.17mol/L 氯化钠溶液稀释,形成一种不透明的红色液体,此为蟾蜍红血细胞悬液。悬液制备后应轻轻反复吹打,使细胞充分分散。

2. 准备计数板 用酒精棉球清洁细胞计数板及专用盖玻片,再用纱布擦净。

3. 加样 细胞计数板上盖专用盖玻片,用无菌细口吸管吸取一滴蟾蜍血细胞悬液,从计数板上盖玻片的边缘一侧缓缓滴入,使之充满计数板和盖玻片之间的空隙中(注意:加样量不要过多溢出盖玻片,流到旁边的凹槽中,也不要过少或带有气泡。不理想时要重新加样,否则会影响细胞计数结果)。

4. 计数 稍候片刻,将计数板放在低倍镜下观察计数。计算出计数板的四角大方格(每个大方格又分 16 个小方格)内的细胞数。计数时,只计数完整的细胞,若聚成一团的细胞则按一个细胞计数,在一个小方格中,如果恰巧有细胞位于小方格的线上,一般计上线细胞不计下线细胞,计左线细胞不计右线细胞(图 1-3)。

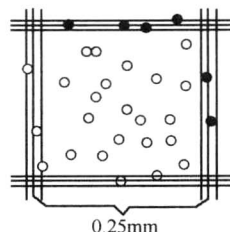


图 1-3 细胞计数方法

5. 计算 计完数后,需换算出每毫升悬液中的细胞数。由于计数板中每一方格的面积为 0.01cm^2 ,高为 0.01cm ,这样它的体积为 0.0001cm^3 即 0.1mm^3 。由于 $1\text{ml}=1000\text{mm}^3$,所以每一个大方格内细胞数 $\times 10^4$ =细胞数/ml,故可按下式计算:

细胞悬液细胞数/ml = 4 个大方格总数 / 4×10^4 (个)

如计算前已稀释,可再乘稀释倍数。

进行细胞计数时应力求准确,因此,在科学研究中,往往将计数板的两侧都滴加上细胞悬液,并同时滴加几块计数板(或反复滴加一块计数板几次),最后取结果的平均值。

【实验报告】

计算每毫升细胞悬液中的细胞数。

【思考题】

为什么细胞计数时,细胞悬液溢出凹槽外或有气泡时要重做?

附录:血细胞计数板构造

细胞计数板是一块特制的厚载玻片,其上有 4 条与长边垂直的凹槽,每两个槽之间构成一个平台,故有三个平台,其中两侧平台比中间平台高 0.1mm 。中间平台较宽,又有一条与长边平行的短槽将其一分为二,在每一半上各刻有一个计数室(图 1-4),每个计数室划分为九个大方格,每个大方格面积为 $1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$,深度为 0.1mm ,盖上盖玻片后容积为 0.1mm^3 。中央的一个大方格又用双线划分为 25 个中方格。