

国家级实验教学示范中心

基础医学实验教学系列教材

第2版

医学细胞分子生物学实验

主编 苑辉卿



科学出版社

国家级实验教学示范中心
基础医学实验教学系列教材

医学细胞分子生物学实验

第2版

主 编 苑辉卿

副主编 田克立 刘奇迹 李 霞 胡晓燕

编 者 (以姓氏笔画为序)

于清水 王 伟 王晓静 田克立 刘永青

刘志方 李 霞 李 曦 吴伟芳 陈丙玺

陈蔚文 苑辉卿 胡晓燕 徐 霞

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

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

内 容 简 介

本实验教材概念准确、文字简明,层次清晰、使用方便,将医学细胞生物学实验、医学生物化学与分子生物学实验、医学遗传学实验3个学科的基本知识点融合在一本教材中,既减轻学生的经济负担,又便于学生和教师了解相关学科的实验内容及学科交叉点,有利于提高教学效果,提高综合素质。全书分为基本实验、综合实验、创新实验3篇。

本书适合医药院校5年制、长学制学生使用,也可供研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞分子生物学实验 / 苑辉卿主编. —2版. —北京:科学出版社, 2013.8

国家级实验教学示范中心·基础医学实验教学系列教材

ISBN 978-7-03-038161-3

I. 医… II. 苑… III. 人体细胞学-分子生物学-实验-医学院校-教材
IV. R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 159137 号

责任编辑:胡治国 / 责任校对:鲁素

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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年8月第 二 版 印张:15

2013年8月第五次印刷 字数:353 000

定价:45.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第2版前言

实验教学是医学教育的重要内容,是培养学生实践能力和创新精神的重要环节。随着科研水平、实验仪器先进程度的迅速提高,人们对人体的认识愈加深入、完善,知识的更新也日新月异,因此实验教学的改革势在必行。我们按照山东大学教学改革的总体规划、医学院校国家实验教学示范中心的改革要求,打破各学科单独的纵向教学模式,将细胞生物学、医学生物化学与分子生物学及医学遗传学三个学科的实验教学内容进行融合,组成医学细胞分子生物学实验平台,删除重复实验,更新陈旧实验,并实现实验教学基本内容分层次、循序渐进;增加以问题为导向的融合实验、创新实验,形成了这本涵盖上述学科的实验教材。本实验教材包括三篇,第一篇为基本实验,分为四章,第一章为医学细胞生物学基本实验,第二章为医学生物化学基本实验,第三章为医学分子生物学基本实验,第四章为医学遗传学基本实验,分别从细胞形态、细胞功能、生物化学、分子生物学、遗传学的基本技能角度,培养学生基本的实验操作能力。此篇虽为培养基本操作技能而设计,但实验内容已进行相当程度的改进,注重先进性与实用性,紧扣目前该领域的发展趋势及临床检验的实际操作,使学生能在将来的工作中尽快适应工作需要。第二篇为综合实验,每个实验都融合了三个学科的相关内容,针对同一问题从不同的方面进行综合分析、验证,培养学生综合分析、解决问题的能力。此篇实验内容体现本教材的改革模式,其实验设计是基于科研的内容和思路而设计,非常有助于启发学生的逻辑性,形成严谨、开阔的思维。第三篇是创新实验,通过启发式的问题,由学生根据所学知识及实验技能,开阔思路、提出实验解决方案,培养学生的独立思考和创新能力。此篇实验内容是开放性实验设计,不拘泥于理论知识、实验技能,也可由学生提出问题并设计可能的解决方案,有助于培养学生的综合能力。由于本教材分层次设计,通过一个主线将若干单个实验相关联,如分子生物学实验内容,体现由基础到综合、由单个到整体的循序渐进过程,有利于进行分段教学,不同学校可结合自己的学时要求、实验条件等选择全部或部分实验用于实验教学。

本实验教材概念准确、文字简明、层次清晰、使用方便,将三个学科的基本知识点融合在一本教材中,既减轻学生的经济负担,又便于学生和教师了解相关学科的实验内容及学科交叉点,有利于提高教学效果及学生的综合素质。

本书适合医学院校五年制、长学制学生使用,也可供研究生参考。

实验十八 体外培养细胞的观察方法	(45)
第二章 医学生物化学基本实验	编者 (50)
第一节 蛋白质的定量分析实验	2013年6月10日 (50)
实验一 双缩脲法测定蛋白质含量	(50)
实验二 Folin-酚法测定蛋白质含量	(51)
实验三 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	(52)
实验四 紫外分光光度法测定蛋白质含量	(53)
第二节 层析分离纯化实验	(54)
实验五 血清中球蛋白的分离纯化与鉴定	(55)
实验六 葡聚糖凝胶分离血红蛋白和 DNP-胰凝乳蛋白酶混合液	(57)
实验七 离子交换层析分离混合氨基酸	(58)

第 1 版前言

多年来的教学实践使我们体会到,实验教学是培养创新型人才的重要环节;实验教学完全依附于理论教学的传统模式不利于创新人才的培养;改革这种传统模式,构建实验教学既与理论教学密切结合,又不依附于理论教学,重在培养学生实践能力和创新精神的新模式势在必行。我们按照山东大学教学改革统一部署,将基础医学中学科内容相关、实验手段相近的三级学科的实验教学融合为一个实验平台,共构建了 5 个实验平台,即由人体解剖学、组织学与胚胎学和病理学融合而成的医学形态学实验平台;由生理学、药理学、病理生理学、医学心理学和神经生物学融合而成的医学机能学实验平台;由医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学融合而成的医学免疫学与病原生物学实验平台;由医学细胞生物学、医学生物化学与分子生物学、医学遗传学融合而成的医学细胞分子生物学实验平台;由诊断学、手术学、实验核医学及临床技能培训中心融合而成的临床技能实验平台。每个实验教学平台都是一个独立的教学单位,独立开设实验课程,独立考核、考试、记学分。

多少年来,实验教学的功能只是验证理论和加深对理论的理解,实验教学的内容也千篇一律、多年一贯。随着实验教学模式的改革,我们对实验教学的内容也进行了深层次的更新,新添了融合性和创新性实验,强化了实验教学的实践和创新功能。每个实验平台都包含 3 个层面的实验,即基本实验、融合实验和创新实验。基本实验与相应学科的理论课同步进行,开设一些经典的验证实验,以巩固理论知识和培养学生的实践动手能力;融合实验是融合了相关学科的知识而设计的一些实验,以培养学生综合运用所学知识、分析和解决问题的能力;创新实验是由教师提出问题并在教师引导下由学生自行设计和完成的一些实验,以培养学生的创新能力。融合实验和创新实验在几个相关学科的理论教学全部完成后进行。在医学院的统一领导下,我们组织了各相关学科的学术带头人和骨干教师,编写了与 5 个实验教学平台相对应的 5 本实验教材,每本教材都分为 3 篇,即基本实验篇、融合实验篇和创新实验篇。

这套实验教学系列教材涵盖了基础医学各学科的全部实验内容,版面字数近百万,内容丰富,文字简明,图表清晰,适用面广。但由于实验教学改革还处于探索阶段,编写这样的改革教材尚无经验可循,加之我们的水平所限,教材中不足之处在所难免,恳请同行专家和同学们批评指正。

高英茂

2007 年 5 月于济南

目 录

第一篇 基本实验

第一章 医学细胞生物学基本实验	(1)
第一节 细胞的显微结构	(1)
实验一 细胞的一般形态结构观察	(1)
实验二 细胞的显微测量技术	(5)
第二节 细胞生理活动	(6)
实验三 胞质环流	(6)
实验四 细胞吞噬	(7)
实验五 细胞活性鉴定	(8)
实验六 细胞融合	(9)
第三节 细胞化学成分的显示	(11)
实验七 普通细胞化学	(12)
实验八 核酸细胞化学	(16)
实验九 酶细胞化学	(19)
实验十 荧光细胞化学与免疫荧光细胞化学	(22)
第四节 细胞增殖	(27)
实验十一 无丝分裂	(28)
实验十二 有丝分裂	(29)
实验十三 减数分裂	(32)
实验十四 X 染色质标本制备与观察	(35)
实验十五 早熟染色体凝集(PCC)的诱导和观察	(36)
第五节 细胞培养	(39)
实验十六 原代细胞培养	(39)
实验十七 细胞传代培养	(42)
实验十八 体外培养细胞的观察方法	(45)
第二章 医学生物化学基本实验	(50)
第一节 蛋白定量分析实验	(50)
实验一 双缩脲法测定蛋白质含量	(50)
实验二 Folin-酚法测定蛋白质含量	(51)
实验三 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	(52)
实验四 紫外分光光度法测定蛋白质含量	(53)
第二节 层析分离纯化实验	(54)
实验五 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	(55)
实验六 葡聚糖凝胶分离血红蛋白和 DNP-胰糜蛋白酶混合液	(57)
实验七 离子交换层析分离混合氨基酸	(58)

第三节 电泳分析实验	(59)
实验八 血清蛋白质乙酸纤维素薄膜电泳	(59)
实验九 血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(61)
实验十 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清 LDH 同工酶	(63)
实验十一 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量	(65)
实验十二 等电聚焦法测定蛋白质等电点	(67)
第四节 酶学实验	(69)
实验十三 pH 对酶促反应速度的影响	(69)
实验十四 温度对酶促反应速度的影响	(72)
实验十五 底物浓度对酶促反应速度的影响——碱性磷酸酶米氏常数的测定	(72)
实验十六 抑制剂对酶促反应速度的影响	(74)
实验十七 酶的提取及比活性测定	(76)
第五节 物质代谢实验	(80)
实验十八 胰岛素对血糖含量的影响	(81)
实验十九 邻甲苯胺法测血糖含量	(81)
实验二十 糖酵解中间产物的鉴定	(82)
实验二十一 血清中谷丙转氨酶活性的测定	(84)
实验二十二 血清脂类含量分析	(86)
第三章 医学分子生物学基本实验	(88)
第一节 分子克隆实验	(88)
实验一 质粒 DNA 的提取与纯化	(88)
实验二 质粒 DNA 浓度和纯度的测定	(90)
实验三 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(92)
实验四 DNA 的限制性酶切反应	(93)
实验五 目的 DNA 和载体 DNA 酶切片段的回收	(94)
实验六 目的基因与载体的体外连接	(95)
实验七 大肠埃希菌感受态细胞的制备	(96)
实验八 重组子的转化及阳性克隆的初步筛选	(97)
实验九 阳性重组子的鉴定	(98)
第二节 外源基因在原核细胞中的表达	(99)
实验十 外源基因在大肠埃希菌的诱导表达和提取	(99)
实验十一 亲和层析法纯化重组蛋白	(100)
第三节 PCR 技术	(102)
实验十二 PCR 扩增目的基因	(102)
实验十三 总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增目的基因	(103)
实验十四 实时定量 PCR 分析真核基因的表达	(107)
第四节 蛋白质的表达分析	(108)
实验十五 蛋白质印迹实验	(108)
实验十六 免疫细胞化学检测细胞内蛋白表达	(110)
实验十七 外源基因在真核细胞中的表达	(112)
第四章 医学遗传学基本实验	(115)
第一节 细胞遗传学实验	(115)
实验一 人类外周血淋巴细胞培养	(115)

实验二 人类外周血淋巴细胞染色体的制备	(116)
实验三 人类染色体 G 显带	(118)
实验四 人类 G 显带染色体核型分析	(119)
实验五 姐妹染色单体交换 (SCE) 标本的制备与观察	(121)
第二节 分子遗传学实验	(123)
实验六 短串联重复序列 (STR) 的多态性分析	(123)
实验七 限制性片段长度多态分析	(127)
实验八 单链构象多态性的检测	(129)
第三节 人类遗传性状分析	(133)
实验九 遗传性状基因型与表型分析	(133)
实验十 遗传病的家系分析和再发风险估计	(135)

第二篇 综合实验

第一章 细胞增殖活力分析	(137)
第一节 细胞增殖的定量分析	(137)
实验一 细胞琥珀酸脱氢酶活性检测 (MTT 法)	(137)
实验二 细胞周期的检测	(138)
第二节 细胞内 ATP 含量测定	(139)
实验三 人淋巴细胞 ATP 活力检测	(139)
第三节 细胞增殖的染色分析	(140)
实验四 BrdU 染色法检测细胞增殖	(140)
实验五 Ki-67 免疫染色法检测细胞增殖	(141)
第二章 细胞凋亡的诱导与检测	(143)
第一节 细胞凋亡的诱导与形态结构观察	(143)
实验一 培养细胞的凋亡诱导	(144)
实验二 台盼蓝染色检测凋亡细胞	(145)
实验三 苏木精-伊红染色检测凋亡细胞	(145)
实验四 Giemsa 染色检测凋亡细胞	(146)
实验五 吖啶橙荧光染色检测凋亡细胞	(147)
实验六 Ho. 33342 与 PI 荧光双染检测凋亡细胞	(148)
第二节 凋亡细胞的超微结构观察	(149)
实验七 透射电镜观察凋亡细胞	(149)
实验八 扫描电镜观察凋亡细胞	(150)
第三节 凋亡细胞的定量分析	(151)
实验九 流式细胞术检测凋亡细胞	(151)
第四节 细胞凋亡的分子生物学特征	(153)
实验十 凋亡细胞 DNA ladder 检测	(153)
实验十一 Caspase 3 酶活性测定	(154)
实验十二 凋亡相关蛋白表达水平检测	(155)
实验十三 凋亡相关基因转录水平的表达检测	(156)
第三章 细胞的自噬与分析	(159)
第一节 细胞自噬的形态学分析	(159)
实验一 透射电镜观察自噬体的形成	(160)

实验二 GFP-LC3 自噬斑点的荧光显微镜检测	(161)
第二节 自噬标志蛋白的表达分析	(162)
实验三 蛋白质印迹法检测自噬标志蛋白的变化	(162)
第四章 真核生物基因表达调控分析	(164)
实验一 甲基化特异性 PCR 检测基因启动子甲基化	(164)
实验二 荧光素酶报告基因瞬时转染分析启动子活性	(167)
第五章 四氯化碳致培养肝细胞损伤的分析	(172)
第一节 培养肝细胞损伤模型的诱导与形态学分析	(172)
实验一 肝细胞损伤的诱导及常规形态检查	(172)
实验二 损伤细胞的脂肪变性检测	(173)
第二节 肝细胞损伤的定量分析	(174)
实验三 CCK 法检测细胞存活率	(174)
第三节 肝损伤细胞相关酶活性的分析	(175)
实验四 肝损伤细胞乳酸脱氢酶活性检测	(175)
实验五 肝损伤细胞谷丙转氨酶活性检测	(176)
第四节 肝损伤细胞相关基因的表达分析	(177)
实验六 肝细胞中 PPAR- γ 1 表达水平的检测	(177)
第六章 人遗传性状基因的分子诊断与应用	(179)
实验一 Duchenne 型肌营养不良的基因诊断	(179)
实验二 多重 RT-PCR 检测染色体易位	(180)
实验三 利用短串联重复序列进行亲权鉴定	(183)

第三篇 创新实验

实验一 糖尿病的生化及遗传检测分析实验	(184)
实验二 唐氏综合征的产前诊断方法	(184)
实验三 家族性高胆固醇血症的诊断方法	(185)
实验四 血友病的诊断	(186)
实验五 重组人促红细胞生成素在细胞中的表达、分离和纯化	(187)
实验六 p53 基因与肿瘤相关性实验设计	(187)
实验七 小鼠组织细胞形态及功能分析	(188)
实验八 小鼠组织特种细胞的形态及特征性成分的鉴定	(189)

附 录

附录一 实验室规则	(190)
附录二 实验室安全及防护	(191)
附录三 实验室常用玻璃仪器的洗涤与清洁	(192)
附录四 生物绘图的要求与方法	(195)
附录五 生物学实验设计报告	(196)
附录六 常用实验技术原理	(197)

第一篇 基本实验

第一章 医学细胞生物学基本实验

第一节 细胞的显微结构

细胞是生命活动的基本结构单位 and 功能单位。人和动物细胞的直径一般为 $10\sim 30\mu\text{m}$, 而人眼的最大分辨率是 $100\mu\text{m}$, 所以人的眼睛是看不到这些细胞的。而光学显微镜的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$, 电子显微镜的分辨率是 0.2nm , 因此要观察细胞或其内部结构, 需要借助光学显微镜和电子显微镜。通常把在光学显微镜下观察到的细胞结构称为显微结构, 电子显微镜下观察到的结构称为超微结构或亚显微结构。

实验一 细胞的一般形态结构观察

【实验目的】

- (1) 掌握光镜下细胞和细胞器的形态结构。
- (2) 掌握临时制片的方法。
- (3) 掌握生物绘图的方法。

【实验原理】 动物有机体的细胞大小有差异, 形态也多种多样, 有圆形、柱形、扁平形、梭形、成纤维形、不规则形等, 各种形态与其功能状态相适应。虽然各种类型细胞形状和大小不一, 但都具有共同的基本结构特点: 都是由细胞膜、细胞质及细胞核组成, 而细胞质中包含有线粒体、高尔基复合体、中心体、细胞骨架等细胞器成分。本实验用光学显微镜观察不同类型的细胞及几种细胞器的形态结构及分布。

【实验内容与方法】

1. 细胞的一般形态结构观察

(1) 蝾螈表皮细胞

1) 标本制备: 取约 5mm^2 新鲜脱落的蝾螈表皮小片, 10% 甲醛溶液固定 4h , 蒸馏水漂洗后 HE 染色, 脱水、透明后树胶封片。

2) 观察: 低倍光学显微镜下找到标本后, 换高倍镜调焦至图像清晰, 可见细胞边界的颜色较浅, 细胞核紫红色、圆形, 位于细胞中央, 核内可见 $1\sim 3$ 个圆形深紫红色核仁, 细胞核内除核仁外还有不均一的紫红色染色质(图 1-1-1)。

(2) 蝾螈小肠柱状细胞

1) 标本制备: 蝾螈小肠石蜡横切片, HE 染色。

2) 观察: 低倍光学显微镜下观察可见蝾螈小肠上皮细胞为柱状, 排列整齐, 高倍镜下可见柱状细胞间有清晰的界限, 细胞顶端游离面有纹状缘, 核圆形, 位于细胞基底部, 为紫红色(图 1-1-2)。

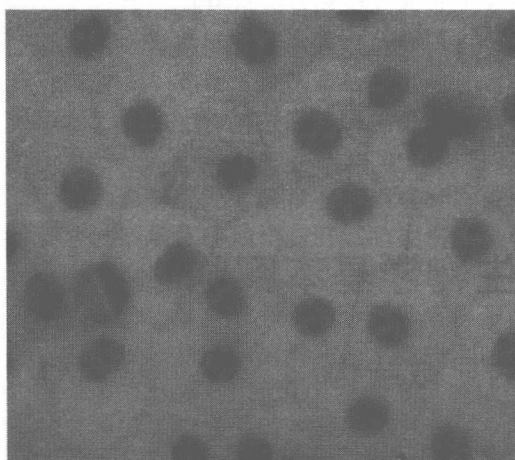


图 1-1-1 蛙表皮细胞镜下图($\times 200$)



图 1-1-2 蛙小肠柱状细胞镜下图($\times 200$)

(3) 神经细胞

1) 标本制备:原代培养新生鼠脊髓神经细胞,HE 染色。

2) 观察:油镜下可见许多有突起的脊髓神经细胞,胞体染成红色,形态多样,突起长短不一(双极神经细胞多为枣核形,三极神经细胞多为三角形),细胞核大而圆,被染成蓝紫色(图 1-1-3)。

(4) 血细胞

1) 标本制备:取耳垂血 1 滴,制备血涂片,瑞氏(Wright)染色。

2) 观察:油镜下,红细胞圆形,粉红色,呈圆盘状,中央略薄,着色浅,四周略厚,无核,数量多。白细胞核明显,核形态多样,有分叶核、肾形核或圆形核(图 1-1-4)。

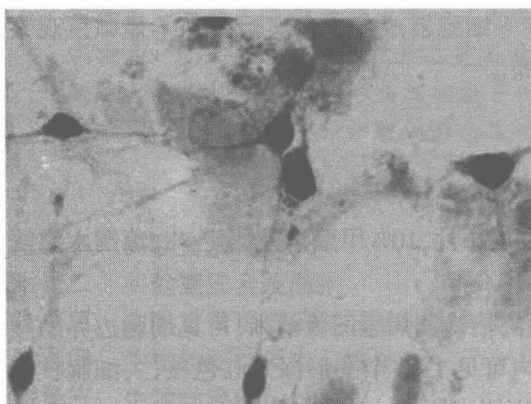


图 1-1-3 新生鼠脊髓神经细胞镜下图($\times 400$)

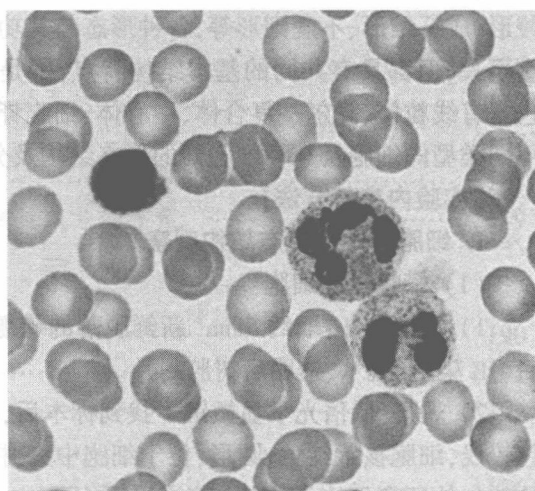


图 1-1-4 人血细胞涂片镜下图($\times 600$)

(5) 小鼠精细胞

1) 标本制备:取成年雄性小鼠睾丸,剪碎,用 2.2% 枸橼酸钠制成精子悬液,推片,晾干后姬姆萨(Giemsa)染色。

2) 观察:低倍镜下可见视野中有多个染成紫红色的蝌蚪样的精子,转换高倍镜,可见精子头部呈镰刀状,深染,紫红色。尾部为一条细长的鞭毛(图 1-1-5)。

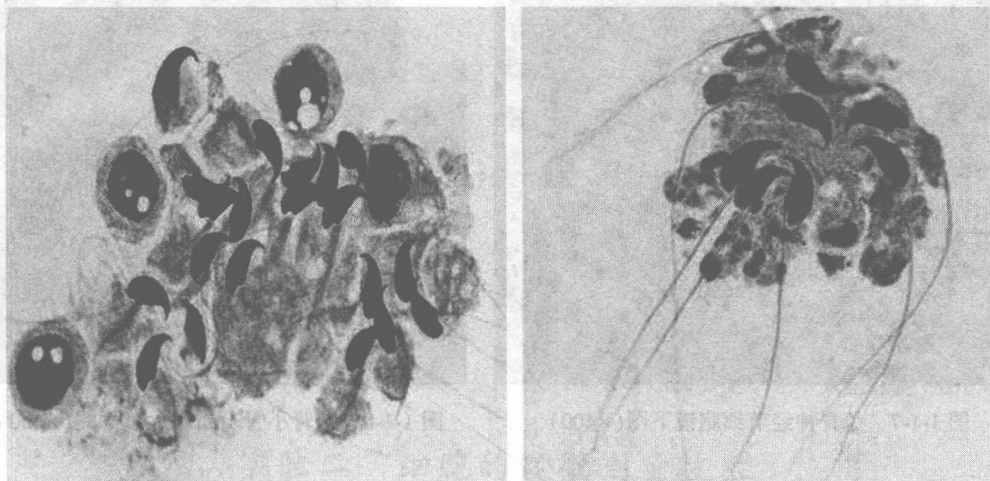


图 1-1-5 小鼠精细胞镜下图($\times 600$)

(6) 小鼠肝细胞

1) 标本制备:小鼠肝组织制备石蜡切片,Feulgen 法染色,亮绿复染细胞质。

2) 观察:低倍镜下观察可见围绕中央静脉辐射状排列的肝索。高倍镜下肝细胞为多边形,染成红色,整齐排列成肝索,细胞核呈圆形,紫红色,位于细胞中央(图 1-1-6)。

2. 细胞器的观察

(1) 高尔基复合体

1) 标本制备:兔脊神经节石蜡切片,镀银染色。

2) 观察:低倍镜下,在神经节内可见多个浅黄色圆形或卵圆形的神经节细胞。高倍镜下观察可见细胞中央有圆形不着色区域,即细胞核。有的核内可见有染成浅黄色的核仁。在核周围的细胞质中高尔基体被染成棕褐色,呈斑块状或扭曲的条索状结构(图 1-1-7)。

(2) 线粒体

1) 方法一:永久制片。

a. 标本制作:制备蛙肾小管石蜡切片,铁苏木精染色。

b. 观察:肾小管在低倍镜下呈圆形、椭圆形的环形管状结构。管壁是由单层锥形细胞构成,中央有管腔。换高倍镜和油镜观察,细胞中央不着色的圆形区是细胞核,内有 1 个或多个染成深蓝色的核仁。细胞界限不清晰。在细胞质里有很多染成蓝黑色的短杆状结构,即线粒体(图 1-1-8)。

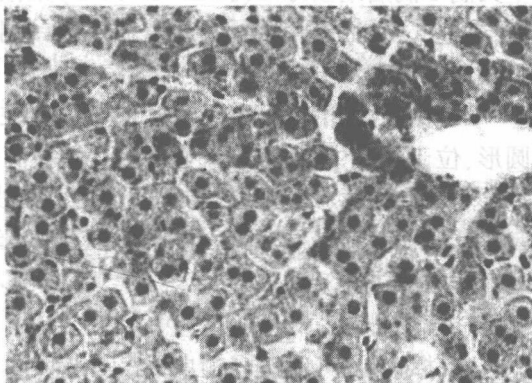


图 1-1-6 小鼠肝细胞切片镜下图($\times 400$)

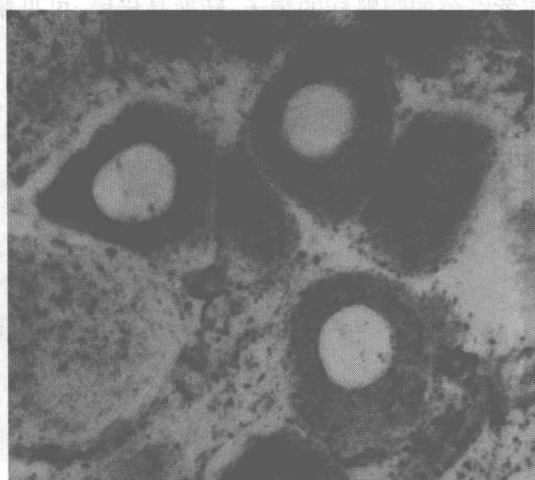


图 1-1-7 兔脊神经节细胞镜下图($\times 400$)

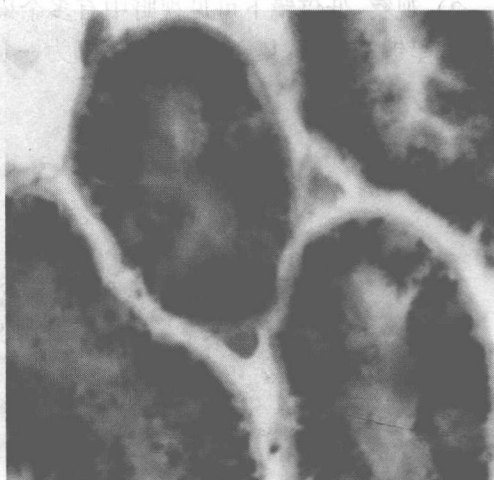


图 1-1-8 蛙肾小管石蜡切片镜下图($\times 600$)

2) 方法二:临时制片(线粒体活体染色)。

a. 人口腔黏膜上皮细胞临时标本片的制备:用绸布擦净载玻片和盖玻片,在载玻片的中央滴 1 滴詹纳斯绿 B (Janus Green B) 染液,用牙签刮取口腔面颊部细胞,均匀涂于染液中,染色 5~10min,用镊子夹住盖玻片的一端,以 45° 倾斜,慢慢落下盖在液滴上,再用吸水纸吸取多余的水分,注意不要产生气泡。

b. 观察:低倍镜下可见成片或分散存在的口腔黏膜上皮细胞呈扁平状,核呈圆形或椭圆形,位于细胞中央,被染成蓝绿色。转换高倍镜观察,可见细胞质中散在一些被染成亮绿色的粒状和短棒状的颗粒,即线粒体。由于线粒体中的细胞色素氧化酶能使詹纳斯绿保持氧化状态而呈淡蓝绿色,而在线粒体以外的细胞质区域的染料则被还原成无色,故能特异地对线粒体进行活体染色。

(3) 中心体

1) 标本制作:制备马蛔虫子宫石蜡切片,铁苏木精染色。

2) 观察:低倍镜下观察马蛔虫子宫切片,可见众多椭圆形的受精卵,选择处于分裂中、后期的细胞,转换高倍镜观察,可见处于分裂中、后期的马蛔虫受精卵的两极各有一颗染色很深的小黑点,这就是中心粒所在的位置。中心粒周围呈透亮区的部分为中心球,两者构成中心体,其外周有许多放射状分布的细丝,即星射线,合称为星体(图 1-1-9)。

(4) 细胞骨架

1) 标本制备:将成纤维细胞培养在盖片上,处理后用考马斯亮蓝 R250 染色。

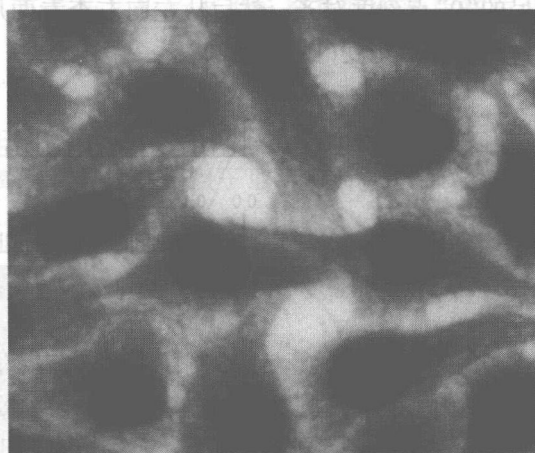
2) 观察:低倍镜下可见成片染成天蓝色的成纤维细胞,细胞核深染,位于细胞中央。转换高倍镜观察,可见沿细胞长轴方向分布着一些被染成蓝色的丝状纤维,这就是由许多微丝聚集而成的微丝束,有的交织成网状(图 1-1-10)。

【实验准备】

1. 材料 蝾螈表皮装片、蝾螈小肠横切片、兔脊髓神经涂片、人血涂片、小鼠精子涂片、小鼠肝细胞切片、兔脊神经节切片、蛙肾小管切片、马蛔虫子宫切片、细胞骨架的染色玻片。

2. 试剂 0.03% 詹纳斯绿 B 染液。

3. 器材 载玻片、盖玻片、吸管、牙签、纱布、擦镜纸、眼科剪、小镊子。

图 1-1-9 马蛔虫子宫石蜡切片镜下图($\times 400$)图 1-1-10 HeLa 细胞中显示微丝的镜下图($\times 400$)

实验二 细胞的显微测量技术

【实验目的】

(1) 熟悉显微测微尺的测量原理及使用注意事项。

(2) 学会在光学显微镜下测量细胞的长度。

【实验原理】 在显微镜下用来测量细胞的工具叫显微测量计,由目镜测微尺(ocular micrometer)和镜台测微尺(stage micrometer)组成,在测量细胞时两种测微尺要配合使用。

目镜测微尺是一块圆形玻片,直径为 20mm,放在目镜上的焦平面上,其上有 10mm 长的线段,分成 100 个小格,每一小格表示的实际长度随不同倍数的物镜和镜筒的长度而不同。

镜台测微尺是一个特制的载玻片,在它的中央有一圆形盖玻片,下面封固着一精细刻度的标尺,标尺全长为 1mm 或 2mm,分为 100 或 200 等份的小格,每小格的长度为 0.01mm ($10\mu\text{m}$),通过目镜测微尺和镜台测微尺刻度的重合,可计算出在

不同倍数物镜下目镜测微尺每小格所表示的长度。在测量细胞时,移去镜台测微尺,换上被测标本,用目镜测微尺即可测得观察标本的实际长度(图 1-1-11)。

【实验内容与方法】

(1) 将目镜测微尺的刻度面向下放入目镜镜筒视野光阑上,观察目镜并旋动目镜,使目镜测微尺呈水平状态,“0”端在左侧。

(2) 将镜台测微尺盖片向上放在载物台上,用低倍镜观察,调节焦距看清镜台测微尺的刻度。

(3) 移动镜台测微尺,同时转动目镜,使目镜测微尺与镜台测微尺平行且重叠,并将两

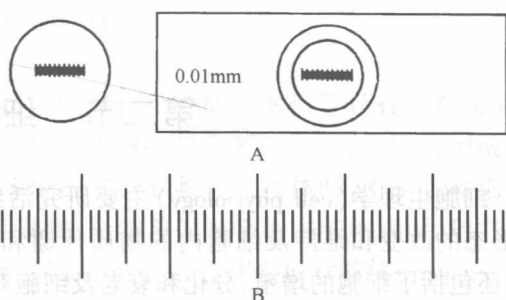


图 1-1-11 测微尺

A. 目镜测微尺和镜台测微尺外观形态;B. 低倍镜下观察镜台测微尺的结果

尺的“0”点刻度对齐。然后从左向右查看两尺刻度线重合处,记录重合处目镜测微尺和镜台测微尺的刻度(图 1-1-12)。



图 1-1-12 目镜测微尺和镜台测微尺实际长度的测算方法

用以下公式计算目镜测微尺每小格表示的实际长度:

$$\text{目镜测微尺每小格实际长度} = \text{镜台测微尺格数} / \text{目镜测微尺格数} \times 10 \mu\text{m}$$

(4) 移去镜台测微尺,换以观察标本(切片或培养细胞),用目镜测微尺测量细胞的大小,所得小格数乘以目镜测微尺每小格实际长度,即为被测物的实际长度。

【实验准备】

1. 材料 待测量细胞的标本片。
2. 器材 显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺。

【注意事项】

- (1) 更换显微镜或使用同一显微镜的高倍镜或油镜测量时,要用同样的方法重新计算高倍镜或油镜下目镜测微尺每小格的实际长度。
- (2) 在测量时要注意将被测物体放在视野中央,因为这个位置镜像最清晰,相差最小。
- (3) 每一种被测物体(细胞)需反复测量数个或数十个,采用其平均值。

(李霞)

第二节 细胞生理活动

细胞生理学(cell physiology)主要研究活细胞的生理活动和生化特性。它不仅包括细胞形态的改变和维持及细胞内的物质代谢和能量代谢、细胞运动、细胞膜的特性、免疫行为,还包括了细胞的增殖、分化和衰老及细胞对外界环境的反应、肌肉收缩、信息传递、神经细胞兴奋和传导的作用机制等。研究和了解细胞的生理活动对于认识生命现象的本质是十分重要的。本节内容主要通过胞质环流、细胞的吞噬现象等几个方面的实验使学生对细胞生理活动有一个初步的认识。

实验三 胞质环流

【实验目的】 观察胞质环流现象,了解其机制。

【实验原理】 细胞质不断流动即为胞质环流(cyclosis, cytoplasm streaming)。通过胞质环流,可实现胞内物质转运,有利于代谢活动的进行。实验证实,胞质环流与微丝的活动有关。对于植物细胞,化学物质和光可激发胞质环流,温度、离子和 pH 可影响胞质环流,机械损伤、电休克或麻醉剂则可使胞质环流停止。凡是减低细胞质黏性的因素,可使胞质环流的速度增加。在某些液泡发达的植物细胞中,胞质环流的现象明显。黑藻嫩

叶、南瓜茎上的表皮毛、鸭跖草蓝色花瓣或小万寿菊花瓣的表皮毛都是观察胞质环流的好材料。

【实验内容与方法】

1. 实验材料 黑藻在实验前采集,培养在盛有清水的玻璃缸内,置于阳光下,培养时要注意观察生长状况,若生长不良要及时补充氧气。实验时用镊子取下一片黑藻顶端嫩叶,放在载玻片上,滴1滴水,盖上盖玻片,放在显微镜下观察。

2. 观察结果 显微镜下可以看到每个细胞内含有许多绿色椭圆形颗粒,即为叶绿体。有些叶绿体和小颗粒在细胞内向着一定的方向做有规则的运动,即为胞质环流(图1-1-13)。

【实验准备】

1. 材料 黑藻。

2. 器材 显微镜、载玻片、盖玻片、镊子。

【思考题】 如果观察到的胞质环流现象不明显,可能是何原因? 用什么办法解决?

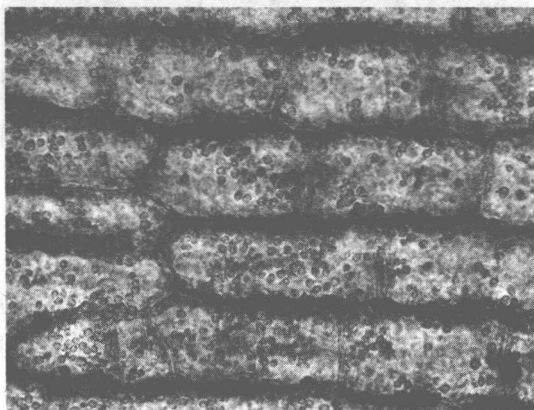


图1-1-13 黑藻叶片胞质环流的镜下图($\times 200$)

实验四 细胞吞噬

【实验目的】

(1) 了解诱导小鼠腹腔巨噬细胞吞噬现象的原理。

(2) 熟悉细胞吞噬作用的基本过程。

【实验原理】 高等动物体内的巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞等具有吞噬功能,它们广泛分布在组织和血液中,在机体的非特异免疫功能中起重要的作用,共同防御微生物的侵入,清除衰老和死亡细胞等。当病原微生物或其他异物侵入机体时,由于吞噬细胞具有趋化性,它通过活跃的变形运动,向异物处聚集,异物首先被吸附在细胞表面,随之吸附区域的细胞膜向内凹陷,并伸出伪足包围异物,接着发生内吞作用形成吞噬体(phagosome),继而在胞内与溶酶体融合,把病原体杀死,将异物消化分解。而单细胞动物则通过细胞吞噬作用(phagocytosis)摄取营养物质。

【实验内容与方法】

1. 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活动观察

(1) 标本制备

1) 实验前2d,每天给小白鼠腹腔注射6%淀粉肉汤(含台盼蓝)1ml,以诱导腹腔内产生较多的巨噬细胞。

2) 实验时,每组取1只经上述处理过的小鼠,向腹腔内注射1%鸡红细胞悬液1ml,轻揉小鼠腹部,使鸡红细胞悬液分散。

3) 20~30min后,用颈椎脱臼法快速处死小鼠,迅速剖开腹腔,把内脏推向一侧,用未装针头的注射器或吸管贴腹腔背壁处抽取腹腔液。

4) 滴1滴腹腔液于载片上,制成临时装片,镜检。

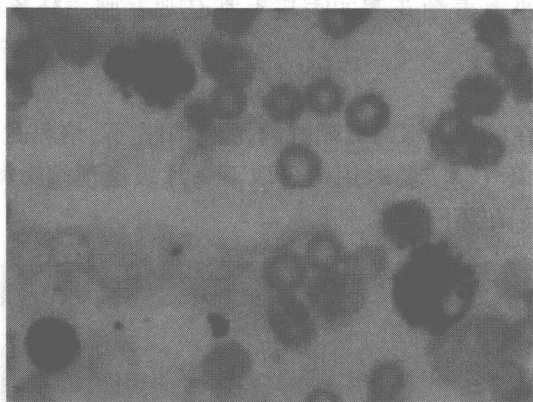


图 1-1-14 小鼠白细胞吞噬细菌的镜下图($\times 400$)

(2) 观察与结果:将视野光线调暗,高倍镜下可看到许多体积较大的圆形或形态不规则的巨噬细胞,胞质中含有数量不等的蓝色颗粒,(这是吞入含台盼蓝的淀粉肉汤所形成的吞噬泡)。鸡的红细胞为淡黄色,椭圆形,有核。变换视野,可看到巨噬细胞吞噬鸡红细胞过程中的不同阶段情况。可见有的鸡红细胞紧贴附于巨噬细胞表面(一至多个),有的红细胞部分或全部被巨噬细胞吞入,形成吞噬泡。有的巨噬细胞内的吞噬泡已与溶酶体融合,泡内物正在被消化分解(图 1-1-14)。

(3) 注意事项

- 1) 向小鼠腹腔内注射时注意不要刺破内脏。
- 2) 腹腔内的吞噬细胞浓度过大时可用生理盐水稀释。

2. 蟾蜍白细胞的吞噬活动观察

(1) 标本制备

1) 用注射器吸取生理盐水稀释墨汁 0.5~1ml,注入蟾蜍尾杆骨两侧的背淋巴囊内,将蟾蜍放在室温环境中。

2) 2~3h 后,用注射器抽取背淋巴囊内的淋巴液,滴在载玻片上,加盖玻片进行观察。

(2) 观察与结果:在高倍镜下,可见许多颜色很浅、圆形或形态不规则的游离的白细胞,(有时可能带有少量的浅红色椭圆形的红细胞)。在部分白细胞中可以看到吞噬进的黑色墨汁小颗粒,这种小颗粒可随细胞的变形运动而运动。有的白细胞正在吞噬墨汁颗粒,做变形运动。

【实验准备】

1. 材料 1% 鸡红细胞悬液、小白鼠、蟾蜍。

2. 试剂 6% 淀粉肉汤(含 0.3% 台盼蓝)、中华墨汁(蛙生理盐水研磨)。

3. 器材 显微镜、注射器、载玻片、盖玻片、解剖剪。

【思考题】

- (1) 为什么要事先向小鼠腹腔注射含台盼蓝的淀粉肉汤?
- (2) 细胞的吞噬活动对生物体有何意义?

实验五 细胞活性鉴定

【实验目的】 学习并掌握死、活细胞鉴别的原理及方法。

【实验原理】 死、活细胞鉴别有许多不同的方法,其中最常用方法是染色排除法。其原理是:许多酸性染料不容易穿过活细胞的细胞膜进入胞内,却能渗入死亡的细胞内,使其着色,以此来鉴别死活细胞。

也可以用荧光排除法来鉴别,其原理是:由于活细胞内有较强的酯酶活性,可将二丙酸酯荧光素中的荧光素分解出来,从而使细胞发出强烈的黄绿色荧光。而死亡的细胞,由于