



全国高等医学院校实验教材



国家级医学基础实验教学示范中心系列教材

供基础医学、临床医学、预防医学、口腔医学等专业类用

医学生物学 实验教程

YIXUE SHENGWUXUE
SHIYANJIAOCHENG

主编/赵彦艳



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

全国高等医学院校实验教材

国家级医学基础实验教学示范中心系列教材

供基础医学、临床医学、预防医学、口腔医学类专业使用

医学生物学实验教程

YIXUE SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

主 编 赵彦艳

副主编 左 伋 邱广蓉 关一夫

方 瑾 陈 澄

编 者 (以姓氏笔画为序)

于爱鸣(中国医科大学) 王 萍(中国医科大学)

方 瑾(中国医科大学) 左 伋(复旦大学上海医学院)

冯 晨(中国医科大学) 刘 洪(中国医科大学)

安 威(中国医科大学)

李宗喜(中国医科大学)

李雪松(中国医科大学) 邱广蓉(中国医科大学)

张惠丹(中国医科大学) 陈 澄(中国医科大学)

邵阳光(中国医科大学) 尚 超(中国医科大学)

尚德淑(中国医科大学) 赵伟东(中国医科大学)

赵彦艳(中国医科大学) 胡晓岩(西安交通大学医学院)

修雪亮(中国医科大学) 黄东阳(汕头大学医学院)

潘兴瑜(中国医科大学) 薛一雪(中国医科大学)



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

医学生物学实验教程/赵彦艳主编. —北京:人民军医出版社,2010.3

全国高等医学院校实验教材

ISBN 978-7-5091-3429-0

I. ①医… II. ①赵… III. ①医学:生物学—实验—医学院校—教材 IV. ①R318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 038473 号

策划编辑:徐卓立 文字编辑:王继云 责任审读:周晓洲 刘立

出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300-8743

网址:www.pmmp.com.cn

印刷:三河市祥达印装厂 装订:京兰装订有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:22 字数:533 千字

版、印次:2010 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3050

定价:59.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内 容 提 要

《医学生物学实验教程》是医学相关专业的学生在学习细胞生物学、生物化学、分子生物学等课程中的实验教材。全书共分4篇,介绍了有关细胞、染色体与核酸、蛋白质、模式生物的92项实验及其原理。其中,染色体与核酸部分包括染色体分析、核酸分析、聚合酶链反应的相关实验;蛋白质部分包括电泳技术、层析技术、酶促反应动力学、蛋白质检测、免疫学的相关实验;模式生物部分包括胚胎发育过程与形态观察、发育与分化过程中标志分子的检测、干细胞研究基本技术、其他重要模式生物和动物功能实验。本书可供临床医学、医学技术、生物工程、预防医学、医学检验等相关医学类专业的学生使用,还可供研究生、临床工作者参考。

国家级医学基础实验教学示范中心

医学基础系列实验教材

出版说明

进入 21 世纪,科学技术的发展瞬息万变,信息高速公路的运转使人才培养工作进入了一个知识爆炸的全新时代,国际科学技术知识大循环带来了又一次科学革命,形成了不可阻挡的潮流。新的时代需求新型人才,创新科学技术产生需要新的人才培养模式,新型师资队伍建设靠与国际先进水平接轨的现代化科学方法熏陶学生。

医学实验学教学改革工作在教育部的领导下已在我国全面铺开,为了培养多用型、综合型人才,国家实施了精品教育工程计划,建立国家级医学实验示范中心是举措之一。正是在这一宏观教育改革精神的指导下,中国医科大学的基础医学被评为“国家级医学基础实验教学示范中心”。从此,医学基础实验课的考试分数与理论课平分天下,各占据半壁江山。

教材是教学的载体,迄今为止我国还没有一套国家规划的专门的医学基础学科实验教材供学生使用,这严重影响了国家教育改革措施的落实。由于中国医科大学是“三基三严”的发祥地,医学基础教育改革在 CMB 课题支撑下引领风骚,医学基础师资底蕴丰厚,因此,从 2008 年起我校示范中心联合其他兄弟院校组织了一系列医学基础课实验学教材的编写。本套实验教材目前陆续出版的有:

- 《人体机能学实验教程》 冯甲棣等主编
- 《医学生物学实验教程》 赵彦艳等主编
- 《组织工程学实验教程》 柏树令等主编
- 《生物医学工程实验教程》 沙宪政等主编
- 《生物医学信息管理学实验教程》 沙宪政等主编
- 《医学实验仪器检测学实验教程》 崔泽实等主编
- 《人体形态科学实验教程》 吕永利等主编
- 《解剖学实验教程》 吕永利等主编
- 《病原生物学实验教程》 罗恩杰等主编

这些教材的编写均是实验教学领域中新的尝试,主要为了适应迅速发展的医学实验教学与人才培养的需要,也是为提高我国的医学教育质量,推动我国医学教育的发展应尽的一份努力,应献的一份爱心。在此,欢迎兄弟院校多给我们提出宝贵意见。

中国医科大学
2009 年 11 月

前 言

当代医学生物技术正处在一个蓬勃发展的鼎盛时期。随着高新技术的日新月异,推动生物学和医学的相互渗透,使医学生物技术不断地推陈出新,尤其是边缘学科的兴起与发展,涌现出许多新观点、新技术,给经典的医学生物理论和技术带来新的机遇和挑战。

本书是一部系统而全面地介绍医学生物技术和原理的实验教材与科学研究的指导性书籍,全书约 30 余万字,分为细胞、染色体与核酸、蛋白质和模式生物四篇,总计选编了 92 个严谨可靠、可操作性强的实验,包括基础性实验、综合性实验和探索性实验。本书在编写过程中突出如下特点:①以能力培养为主线,从分子、细胞水平到整体水平分层次地介绍了医学生物技术的传统方法与现代技术。②既注重基础理论和基本技能的阐述,又结合作者本人的实践操作经验,集中反映近年来医学生物技术的发展和运用,力求使内容更深入、具体,便于理解。③每个实验都有相应的基础知识、背景资料和相关知识链接介绍,力求使内容更具系统性、科学性和先进性。④教材配有大量的插图,使之更直观、生动、形象。⑤编者均从事医学生物教学与科研工作多年,既有丰富的教学经验,又有扎实的实验室工作基础,使教材具有较强的针对性和实用性。因此,本书既可作为医学本科生、研究生的实验教材,也可作为临床医学和基础医学科学研究的参考书。

著名学者孙开来教授为本书的编写提出了许多建设性意见,同时,我们诚邀复旦大学上海医学院左伋教授、首都医科大学安威教授、汕头大学医学院黄东阳教授、西安交通大学医学院胡晓岩教授参与编写工作,在此深表谢意。

本书的不当之处,真诚地希望同行及使用者给予指正赐教,以期今后进一步修订与完善。

编 者

2009 年 10 月

目 录

第一篇 细 胞

实验一 动物细胞的基本形态观察和显微测量	(2)
实验二 Brachet 反应显示细胞中的 DNA 和 RNA	(5)
实验三 细胞中过氧化物酶的显示	(7)
实验四 细胞中碱性蛋白的显示	(9)
实验五 细胞中线粒体的活体染色	(11)
实验六 细胞中液泡系的活体染色	(12)
实验七 细胞融合	(14)
实验八 细胞的原代和传代培养	(17)
实验九 培养细胞的形态观察和计数	(21)
实验十 细胞生理活动的观察	(26)
实验十一 细胞核与线粒体分级分离	(29)
实验十二 检测 T 淋巴细胞及其功能的体外实验	(32)
一、T 细胞及其亚群的鉴定和检测	(32)
二、T 细胞功能体外检测法	(34)
实验十三 NK 细胞活性的检测	(37)
实验十四 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬实验	(39)
实验十五 细胞中微丝的染色及微丝与细胞形态的实验观察	(40)
实验十六 亚细胞器的分离与分析鉴定	(43)
一、亚细胞器的分离	(43)
二、线粒体的鉴定	(44)
三、Western Blotting 检测内质网和高尔基体的标志蛋白	(45)
实验十七 应用细胞融合技术制备染色体提前凝集标本	(48)
实验十八 放线菌素 D 诱导 HL60 细胞凋亡的实验观察	(51)
实验十九 MAPK 信号通路乳腺癌细胞增殖及可能机制	(60)

第二篇 染色体与核酸

第一部分 染色体分析相关实验	(72)
实验一 人类体细胞染色体标本制备与核型分析	(72)
实验二 羊水细胞培养及染色体标本制备	(82)
实验三 X 和 Y 染色质标本的制作与观察	(85)
实验四 姊妹染色单体交换实验	(88)
实验五 银染核仁形成区与近端着丝粒染色体随体联合	(90)
实验六 荧光原位杂交(21 号染色体长臂特异探针)	(92)
第二部分 核酸分析相关实验	(98)
实验七 基因组 DNA 提取	(98)
实验八 组织总 RNA 提取	(100)
实验九 DNA 重组技术	(101)
实验十 报告基因载体构建及活性检测	(106)
实验十一 染色质免疫沉淀	(110)
实验十二 凝胶阻滞实验	(112)
实验十三 哺乳动物细胞的转基因及鉴定	(116)
实验十四 小 RNA 研究基本技术	(119)
实验十五 Southern 印迹杂交	(125)
实验十六 Northern 印迹杂交	(127)
第三部分 聚合酶链反应(PCR)相关实验	(130)
实验十七 PCR-RFLP 分析技术	(130)
实验十八 PCR-SSCP	(133)
实验十九 PCR-DGGE	(136)
实验二十 PCR-DHPLC	(139)
实验二十一 Real-time PCR 检测 mRNA 表达	(141)
实验二十二 Real-time PCR 进行基因型检测	(144)
实验二十三 甲基化特异性 PCR	(145)
实验二十四 免疫 PCR	(149)
实验二十五 SNP 检测及关联分析	(153)
实验二十六 血红蛋白病的基因诊断	(161)

第三篇 蛋 白 质

第一部分 电泳技术	(168)
实验一 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(168)
实验二 等电聚焦电泳	(176)
实验三 双向电泳	(180)
第二部分 色层分析法相关实验	(191)
实验四 凝胶过滤层析法蛋白质除盐	(191)

实验五 纤维素离子交换层析法纯化蛋白	(197)
实验六 伴刀豆球蛋白琼脂糖亲和层析法纯化蛋白质	(199)
实验七 氨基酸纤维素薄层层析	(202)
第三部分 酶促反应动力学相关实验	(204)
实验八 酶的特异性、激动药及抑制药	(204)
实验九 pH 对酶活性的影响	(206)
实验十 底物浓度对酶活性的影响——碱性磷酸酶 K_m 值的测定	(208)
实验十一 抑制药对酶活性的影响	(211)
实验十二 温度对酶促反应速度的影响	(212)
第四部分 蛋白质检测相关实验	(214)
实验十三 比色分析法和分光光度法测定蛋白质含量	(214)
实验十四 免疫印迹	(219)
实验十五 免疫沉淀 SD 大鼠骨骼肌细胞核 α_1 -AMPK 蛋白	(226)
实验十六 α_1 -抗胰蛋白酶活性测定	(229)
实验十七 酵母双杂交	(230)
实验十八 CyclinE 蛋白在细胞周期 G1/S 期的表达	(233)
实验十九 含有目的基因真核表达 pEGFP-C1 载体的构建	(238)
一、PCR 反应扩增目的基因片段	(238)
二、凝胶回收 PCR 反应片段	(239)
三、将目的片段克隆到 pEGFP-C1 载体中	(240)
四、转化感受态细胞	(242)
五、提取质粒并进行酶切鉴定	(242)
第五部分 免疫学相关实验	(245)
实验二十 凝集反应	(245)
一、直接凝集试验	(245)
二、间接凝集试验	(248)
实验二十一 沉淀反应	(251)
一、琼脂扩散试验	(251)
二、环状沉淀反应	(254)
三、免疫电泳试验	(255)
实验二十二 补体参与的反应	(257)
一、溶血反应	(257)
二、溶血空斑试验	(258)
三、50 % 溶血法 (CH_{50}) 测总补体活性	(260)
实验二十三 免疫标记技术	(263)
一、酶联免疫吸附试验	(263)
二、免疫荧光技术	(265)
实验二十四 细胞因子检测	(268)
一、白细胞介素-2 的检测	(268)

二、肿瘤坏死因子测定	(269)
------------------	-------

第四篇 模式生物

实验一 不同发育阶段小鼠胚胎形态观察	(274)
实验二 鸡胚胎早期发育过程的形态观察	(275)
实验三 免疫组化检测小鼠肺发育过程中标志分子的表达	(278)
实验四 地高辛标记寡核苷酸探针检测大鼠海马褪黑素受体 1a	(280)
实验五 Western-ECL 方法检测不同发育时期鸡胚脑组织中 Grp94 的表达	(284)
实验六 染色质免疫沉淀比较肺发育不同阶段 SPC 启动子的活性	(288)
实验七 囊胚的观察	(291)
实验八 小鼠胚胎成纤维细胞培养	(293)
实验九 骨髓间充质干细胞制备及定向诱导分化	(294)
实验十 胚胎干细胞端粒酶活性检测	(297)
实验十一 酵母质粒 DNA 的提取	(298)
实验十二 酵母的接合实验	(300)
实验十三 酵母感受态细胞的制备及酵母的转化	(302)
实验十四 立体定位技术及 C6 脑胶质瘤模型制作	(304)
实验十五 微电极控制技术及其在大鼠海马 LTP 的实验观察	(308)
实验十六 激光多普勒血流仪监测大鼠脑缺血时血流	(312)
实验十七 大鼠 Morris 水迷宫、跳台及穿梭箱实验方法	(316)
实验十八 辣根过氧化物酶(HRP)追踪法	(320)
实验十九 Nissl, Cajal, Marchalls 染色	(322)
一、Nissl 染色法	(322)
二、Cajal 染色法	(323)
三、Marchalls 法	(323)
实验二十 中枢神经通路损毁模型的建立	(324)
实验二十一 中枢给药:小鼠脑室给药,大鼠侧脑室给药,兔脑室灌流的操作方法	(331)
实验二十二 突触小体和离体脑片的制备	(334)
实验二十三 神经元和星形胶质细胞的分散培养技术	(337)

第一篇

Part 1

细 胞

一切生物均由细胞组成,细胞是生物形态结构和功能的基本单位,一切病理现象都基于细胞的损伤,对细胞生命现象的研究是我们深入理解细胞、理解生命、探寻致病机制及疾病的预防和治疗等的重要基础。

细胞的研究在最近 50 年来取得了令人瞩目的进步,并且随着研究手段的不断改进,对细胞的微细结构和功能的研究都取得了突出的成就。本部分实验在经典的细胞研究方法的基础上,进一步丰富了实验内容,增加了研究深度,使学生能对细胞的研究技术有更加全面的了解,对细胞的结构与功能有更加系统的理解。

实验内容包括细胞形态观察、化学研究、培养、融合、生理活动观察和免疫细胞功能研究等细胞生物学基础性实验,微丝结构与功能研究、细胞凋亡、亚细胞器分离、染色体提前凝集等综合性实验以及有关细胞信号转导的设计性实验。旨在全方位、深层次培养学生的实践技能。

【实验目的】

1. 掌握不同动物细胞临时制片的方法。
2. 掌握显微镜和测微尺的基本使用方法。
3. 熟悉捣髓法处死蟾蜍的方法。
4. 熟悉各种常用解剖器材的使用及细胞生物学实验绘图方法。
5. 了解不同动物细胞的基本形态。

【实验原理】

细胞的形态结构与功能相关是很多细胞的共同特点,在分化程度较高的细胞更为明显,这种合理性是生物漫长进化过程所形成的。例如:具有收缩功能的肌细胞伸展为细长形;具有感受刺激和传导冲动功能的神经细胞有长短不一的树枝状突起;游离的血细胞为圆形、椭圆形或圆饼形。

不论细胞的形状如何,细胞的结构一般分为三大部分:细胞膜、细胞质和细胞核。但也有例外。例如:哺乳类红细胞成熟时细胞核消失。

测微尺分目镜测微尺和镜台测微尺,两尺配合使用。目镜测微尺是一个放在目镜像平面上的圆形玻片,玻片中央有一长5~10mm的刻度尺,分成50~100格,每格代表的长度随不同物镜的放大倍数而异。因此,用前必须测定。镜台测微尺是在一个载片中央封固的尺,长1~2mm,被分为100~200格,每格长度是10 μ m。当测量细胞大小时,须先在显微镜下用物镜测微尺核实目镜测微尺的每一格长度,然后再用目镜测微尺去测定标本。

【实验材料】

1. 试剂 1%甲苯胺蓝,1%甲基蓝,Ringer液(两栖类用)。
2. 仪器 配有目镜测微尺的显微镜,镜台测微尺。
3. 耗材 载玻片若干,盖玻片若干,吸水纸,手术器材1套,解剖盘1个,小平皿1个,牙签,蟾蜍1只,人血液1滴。

【实验步骤】**(一)动物细胞的基本形态观察**

1. 制备蟾蜍脊髓压片观察脊髓前角运动神经细胞 取蟾蜍1只,破坏脑和脊髓,在口裂处剪去头部,除去延髓,剪开椎管,可见乳白色脊髓,取下脊髓放在平皿内,用Ringer液洗去血液后放在载玻片上,剪碎。将另一载玻片压在脊髓碎块上,用力挤压。将上面的载玻片取下即可得到压片。在压片上滴1滴甲苯胺蓝染液,染色10min,盖上盖玻片,吸去多余染液,显微镜下观察。

2. 蟾蜍骨骼肌细胞的剥离与观察 剪开蟾蜍腿部皮肤,剪下一小块肌肉,放在载玻片上,用镊子和解剖针剥离肌肉块成为肌束,继续剥离,可得到很细的肌纤维(肌细胞)。尽可能拉直肌纤维,显微镜下观察。

3. 蟾蜍肝脏压片的制备与观察 剪开蟾蜍腹腔,取一小块(2~3mm³)肝放在平皿内,用Ringer液洗净,用镊子轻压将肝中的血挤出。然后放在载玻片上,制片方法同脊髓压片。在压片上滴1滴甲基蓝染液,染色10min,盖上盖玻片,吸去多余染液,显微镜下观察。

4. 蟾蜍血涂片的制备与观察 取1滴蟾蜍血液,靠近一端滴在载玻片上,将另一载玻片的一端呈45°紧贴在血滴的前缘,均匀用力向前推,使血液在载玻片上形成均匀的薄层(图1-1)。晾干,显微镜下观察。

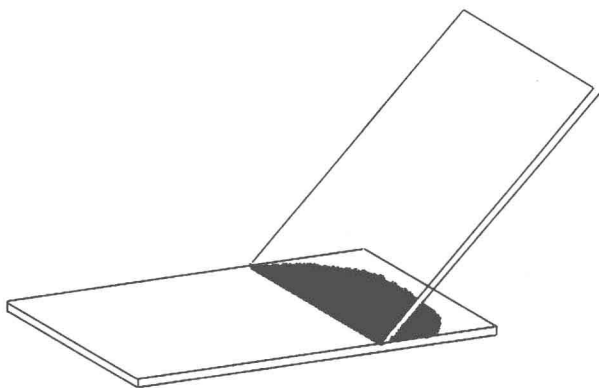


图 1-1 血涂片的制备

5. 人血涂片的制备与观察 取人血1滴,制片方法同上,显微镜下观察。

6. 人口腔上皮细胞标本的制备与观察 用牙签刮取口腔上皮细胞,均匀地涂在载玻片上(不可反复涂抹),滴1滴甲苯胺蓝染液,染色5min,盖上盖玻片,吸去多余染液,显微镜下观察。

(二)测微尺的使用

1. 将镜台测微尺放在显微镜的载物台上夹好,小心转动目镜测微尺和移动镜台测微尺,使两尺平行,记录镜台测微尺若干格所对应的目镜测微尺的格数(图1-2)。

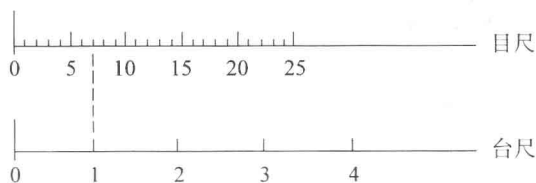


图 1-2 显微测微尺目尺与台尺示意图

2. 按下式求出目镜测微尺每格代表的长度:

$$\text{目尺每格长度}(\mu\text{m}) = \frac{\text{台尺的格数}}{\text{目尺的格数}} \times 10 \mu\text{m}$$

【实验结果与分析】

(一)动物细胞的基本形态观察

1. 蟾蜍脊髓前角运动神经细胞观察 镜下染色较深的小细胞是神经胶质细胞。染成蓝紫色的、大的、有多个突起的细胞是脊髓前角运动神经细胞,胞体呈三角形或星形,中央有1个圆形细胞核,内有1个核仁。

2. 蟾蜍骨骼肌细胞观察 镜下肌细胞为细长形,可见折光不同的横纹,每个肌细胞有多个核,分布于细胞的周边。

3. 蟾蜍肝脏细胞观察 镜下可见肝细胞核染成蓝色,肝细胞紧密排列,挤成多角形。

4. 蟾蜍血细胞观察 镜下可见蟾蜍红细胞为椭球形,有核。白细胞数目少,为圆形。
5. 人血细胞观察 镜下可见人红细胞为双凹圆盘形,无核。白细胞数目少,为圆形。
6. 人口腔上皮细胞标本观察 镜下可见覆盖口腔表面的上皮细胞为扁平椭圆形,中央有椭圆形核,染成蓝色。

(二)测微尺的使用

$$\text{目尺每格长度}(\mu\text{m}) = \frac{1}{7} \times 10 \mu\text{m} = 1.429 \mu\text{m}$$

【注意事项】

1. 捣髓法处死蟾蜍的要点:注意寻找枕骨大孔的位置、解剖针的刺入位置及方向、捣毁颅脑和脊髓的顺序、判断捣髓法是否成功的标准。

2. 不同浓度 Ringer 液的使用对象及作用。

3. 制作肝脏压片时取肝脏尽量取边缘部分。

4. 细胞生物学实验绘图方法与要求

(1)在仔细观察的基础上,选择典型结构进行描绘,要求真实、准确(注意各部结构的比例关系)。

(2)用铅笔绘图,线条要明确清晰,图的深浅明暗一律以点的疏密来表示,点要圆而一致,不得用涂暗影或进行其他美术加工。

(3)各部结构名称要在一侧引直线注明。各引线要平行不得交叉。

(4)每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当并注意纸面的清洁。

【附录】

(一)试剂及配制

1. 1% 甲苯胺蓝的配制 称取 1g 甲苯胺蓝粉末,溶于 100ml 双蒸水中即可。

2. 1% 甲基蓝 称取 1g 甲基蓝粉末,溶于 100ml 双蒸水中即可。

3. Ringer 液 氯化钠 0.9g(冷血动物用 0.65g),氯化钾 0.042g,氯化钙 0.025g,蒸馏水加至 100ml。

(二)实验回报表

1. 绘制观察到的 6 种动物细胞。

2. 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:

3. 计算蟾蜍红细胞的核质比例。

计算细胞、细胞核体积的公式:

圆形 $V = 4/3\pi r^3$ (r 为半径)

椭圆形 $V = 4/3\pi ab^2$ (a、b 为长、短半径)

核质比 $N/D = V_n / (V_c - V_n)$ (V_n 为核的体积, V_c 是细胞质的体积)

【相关知识链接】

1. 简述红细胞的起源及发育过程。

(1) 红细胞起源于骨髓造血干细胞。

(2) 发育过程: 红系定向干细胞 → 原红细胞 → 早幼红细胞 → 中幼红细胞 → 晚幼红细胞 → 网织红细胞 → 成熟红细胞。

2. 为什么人的红细胞没有细胞核?

人和哺乳类的红细胞是无核的, 而鸟类、两栖类、鱼类的红细胞是有核的。人血液中的红细胞没有细胞核, 它是由骨髓中的原始红细胞经过 4 次细胞有丝分裂发展成的。红细胞的形成过程是核幼稚红细胞到无核网织红细胞再到成熟红细胞发育过程。这其中包括排掉细胞核的过程, 具体的原因尚不清楚, 也许节省空间也是一种解释。我们的红细胞排核之后, 因为不能自身代谢, 会在 100~20d 后被我们血液中的巨噬细胞所吞噬。我们血液的成分同样会在一定的周期之内被完全换 1 次。

【思考题】

1. 思考动物细胞形态与功能上的联系。

2. 试述分离和纯化细胞组分的方法。

参 考 文 献

- [1] 陈誉华. 医学细胞生物学. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [2] 章静波. 医学细胞生物学实验指导及习题集. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [3] 田中克己. 显微镜的使用方法. 北京: 科学出版社, 1960.
- [4] Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. Essential Cell Biology. 2nd ed. New York: John Wiley Sons Inc, 2003.
- [5] Cooper GM. The Cell Molecular Approach. Washington DC: Sinauer ASSOCIATES. Inc, 1997.

实验二

Brachet 反应显示细胞中的 DNA 和 RNA

Visualization of DNA and RNA in cells by Brachet reaction

【实验目的】

1. 掌握 Brachet 反应的染色方法。
2. 了解 Brachet 反应的基本原理。

【实验原理】

DNA 是细胞的重要生命物质, 决定生物体的遗传性状。RNA 在生命活动中同样具有重要作用, 目前认为它和蛋白质共同负责基因的表达及其调控。在真核细胞中, DNA 主要存在于细胞核中, 而 RNA 是在细胞核内合成, 然后转移至细胞质指导蛋白质的翻译过程。DNA 以双螺旋空间结构形式存在, 而 RNA 通常呈单链形式, 局部可形成二级或三级结构。Brachet 反应即利用了 DNA 和 RNA 这种结构上的差异, 采用不同染料同时显示两者在细胞中的分布情况。

甲基绿、派洛宁(methyl green-pyronin)为带有正电荷的碱性染料, 可与带有负电荷的核酸分子结合, 两种染料的作用具有选择性, 甲基绿带有两个正电荷, 易与双链的 DNA 分子结

合,使其显示蓝绿色;派洛宁带有一个负电荷,易与单链的 RNA 分子结合,使其显示红色。也有人认为其染色原理与 DNA 和 RNA 分子的不同聚合程度有关。细胞经甲基绿-派洛宁混合液处理后,其 DNA 和 RNA 出现不同的显色反应,以此可对细胞中的 DNA、RNA 进行定位、定性和定量分析。

【实验材料】

1. 试剂 DMEM 培养液, PBS(pH7.2), Carnoy 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1), 甲基绿-派洛宁混合液, 蒸馏水, 丙酮, 二甲苯, 中性树胶。

2. 仪器 普通光学显微镜, CO₂ 培养箱。

3. 耗材 HeLa 人宫颈癌细胞, 尖头镊子, 染色缸, 盖玻片, 载玻片, 吸管, 吸水滤纸。

【实验步骤】

1. 将 DMEM 培养的 HeLa 细胞接种于盖玻片, 24~48 h 后生长为单层。

2. 取细胞盖玻片一张, 用 PBS(pH7.2) 漂洗 3 次, 滤纸吸去液体。

3. 滴加 Carnoy 固定液, 室温下固定 30min, 弃去固定液。

4. 向盖玻片滴加甲基绿-派洛宁混合液, 染色 30min。

5. 蒸馏水轻轻漂洗 2~3 次(每次 2~3 s), 滤纸吸去多余水分。

6. 盖玻片浸入丙酮中分色 2~3 s。

7. 浸入 1/2 丙酮+1/2 二甲苯中 5 s。

8. 浸入纯二甲苯中透明 5min。

9. 滴 1 滴中性树胶于载玻片上, 将盖玻片细胞面朝下封片。

10. 镜下观察。

【实验结果与分析】

DNA 主要分布于细胞核中, RNA 主要分布于核仁及细胞质中, 因此, 经甲基绿-派洛宁混合染料染色后, 细胞质被染成红色, 细胞核被染成蓝绿色, 其中核仁被染成紫红色。

【注意事项】

1. 本实验的关键是使细胞中的 DNA 和 RNA 同时呈现不同的颜色, 这与操作过程和试剂的使用密切相关, 需要特别注意的是: ①派洛宁易溶于水, 在用蒸馏水漂洗盖玻片时要严格控制时间, 并注意观察颜色变化, 防止过度脱色; ②丙酮在本实验中起分色作用, 目的是使两种颜色均能清晰显示。分色效果主要受时间的影响, 不同批次的染色试剂、不同的细胞种类和状态通常需要不同的分色时间, 在实际操作时, 可先以短时间进行预试, 或预设不同时间进行试验, 把握好这一环节, 通常可以得到较好的结果。

2. 本实验采用盖玻片培养细胞, 因此在整个操作过程中, 应注明盖玻片的正反面, 防止破坏细胞面。

【附录】

(一) 试剂及配制

1. PBS(pH7.2)

0.01mol/L PBS(磷酸盐缓冲液 Phosphate Buffer Saline, PBS)pH7.2。

0.2mol/L 磷酸二氢钠液(甲液): NaH₂PO₄ · 12H₂O 35.814g, 双蒸水加至 500ml。

0.2mol/L 磷酸二氢钠液(乙液): NaH₂PO₄ · 12H₂O 15.601g, 双蒸水加至 500ml。

取甲液 36ml, 乙液 14ml 和 NaCl 8.2g, 加双蒸水至 1 000ml。混匀、分装, 经高压灭菌后保

存于 4℃ 冰箱备用。

2. 甲基绿-派洛宁混合液

(1) 1mol/L 醋酸盐缓冲液(pH4.8):冰醋酸 6ml,加蒸馏水至 100ml;醋酸钠 13.5g,加蒸馏水至 100ml。用时分别取两液 40ml、60ml 混匀即可。

(2)甲基绿-派洛宁(methyl green-Pyronin):5%派洛宁水溶液 6ml,2%甲基绿水溶液 6ml,蒸馏水 16ml,1mol/L 醋酸缓冲液 16ml。1mol/L 醋酸缓冲液临用时才可加入染液中。

(二)实验回报表

绘出 Brachet 反应中的镜下所见。

【思考题】

1. 简述 Brachet 反应的染色原理。
2. 本实验操作的关键步骤是什么?

参 考 文 献

- [1] 陈誉华. 医学细胞生物学, 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2008.
- [2] 章静波. 医学细胞生物学实验指导及习题集. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [3] 陈啸梅. 组织化学手册. 北京:人民卫生出版社, 1982.
- [4] 马仲魁. 组织化学. 北京:人民卫生出版社, 1986.
- [5] Perse AGE. Histochemistry. New York: Churchill Livingston, 1980.
- [6] Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. Essential Cell Biology. 2nd ed. New York: John Wiley Sons Inc, 2003.
- [7] Cooper GM. The Cell Molecular Approach. Washington D C: Sinauer ASSOCIATES. Inc, 1997.

实验三

细胞中过氧化物酶的显示

Visualization of peroxidase in cells

【实验目的】

1. 掌握细胞中过氧化物酶的染色方法。
2. 了解过氧化物酶显示反应原理。

【实验原理】

过氧化物酶是肝、肾、中性粒细胞及小肠黏膜上皮细胞中存在丰富的酶类,较多存在于细胞的过氧化物酶体中,参与细胞中的各种氧化反应,可将各种底物氧化。本实验利用过氧化物