

高等学校教学参考书

汪德耀 主编

细胞生物学 实验指导

高等教育出版社

58.15
241

高等学校教学参考书

细胞生物学实验指导

汪德耀 主编

2K548/13

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是一九七七年十月教育部在成都召开的全国生物学科教材编写会议上决定编写的一本参考书，并在一九八〇年四月教育部委托厦门大学生物系举办的“细胞生物学实验技术培训班”上使用后定稿。内容包括各种光学显微镜术、活体染色、细胞化学、放射自显影、细胞培养、显微照相术等，除了细胞生物学的基本实验技术外，还有新的实验方法，其中有些是编者在实践的基础上总结出来的。本书可供高等学校生物系师生以及有关科研工作者参考。

本书原由人民教育出版社出版。1983年3月9日，上级同意恢复“高等教育出版社”。本书今后改用高等教育出版社名义继续印行。

高等学校教学参考书
细胞生物学实验指导
汪德耀 主编

高等教育出版社出版
新华书店北京发行所发行
北京顺义印刷厂印装

开本850×1168 1/32 印张12.5 字数300,000

1981年12月第1版 1986年3月第4次印刷

印数20,861—24,380

书号 13010.0663 定价 2.10 元

前 言

根据 1977 年 10 月教育部在成都召开的全国生物学类教材编写会议决定,我们负责编写《细胞生物学实验指导》,主要是提供高等院校教师、科研人员参考之用。但由于我们水平有限,加上考虑各高等院校现有的设备条件,所以内容并不包括细胞生物学的所有方法和技术,只选编了最基本和最主要的。

1977 年 12 月我们首先拟写一个《细胞生物学实验》教材编写大纲(征求意见稿),送各有关兄弟院校审阅,并提出修改意见。在此基础上我们开始编写,因教学、科研工作较忙,直到 1979 年 3 月才完成初稿,次年 4 月教育部委托厦门大学生物系举办重点大学“细胞生物学实验技术培训班”,为期二个多月,参加学员为高等院校教师(大部分为讲师),我们将这个实验指导初稿对学员进行了讲授。通过实践,普遍认为这本实验指导是实用的。除了细胞生物学的基本实验技术外,还有细胞生物学的新的实验方法。

在培训班结束之前,我们专门召开了座谈会,大家对实验指导提出了许多宝贵的补充修改意见。我们在此基础上对初稿进行修改和定稿。

本教材由厦门大学生物系细胞生物学教研室有关同志集体编写。第二、四两章由汪德耀教授执笔,并亲自在培训班讲授,总结了他多年的经验,反映较好;第一章由黄宗平编写;第三、五两章由林美英编写;第六章由陈瑞美和洪维廉编写;第七、八、九三章由陈睦传编写;第十章实验实例二十个,实验十三由陈厦山编写;实验十六由陈睦传编写;实验十八由洪维廉编写;实验二十由楼士林编写;其余十六个实验由林美英编写。全书插图由张之江绘制。北京师范大学生物系薛绍白先生对“孚尔根显微分光光度计的用法”

• 1 •

原稿作了修改补充,编者对薛绍白先生深表谢意。

我们希望这一本实验指导,能够对高等院校教师、科研工作人员的教学和科研有所帮助。

由于编者知识有限,可能有不少错误,敬请读者加以批评指正,以便再版时修改。

编 者

1981年7月于厦门大学

目 录

绪论	1
第一章 各种光学显微镜术	4
第一节 复式显微镜	4
一、显微镜的构造和各部分的用途	5
(一)光学系统	5
(二)机械装置	8
二、显微镜的光学原理及其主要性能	10
(一)显微镜的光学原理	10
(二)显微镜的主要性能	11
三、显微镜的使用和注意事项	18
(一)观察前的准备工作	18
(二)显微镜的照明操作	20
(三)聚光器和物镜配合的操作和滤光片的选择	22
(四)观察操作和油镜的使用	24
(五)观察后的处理工作	25
(六)镜检过程中遇到的问题和分析	27
第二节 相差显微镜与活细胞观察	27
一、相差显微镜及其用途	27
二、相差显微镜的结构	28
(一)环状光阑	28
(二)相板	29
(三)中心望远镜	31
(四)光源和滤光器	31
三、相差显微镜的原理	32
(一)相差	33
(二)衍射和干涉	33
四、相差显微镜的用法	36
(一)相差显微镜的装置	36
(二)调焦和调光	37
(三)中心调节	37

(四) 相板的选择	39
五、相差显微镜标本的制作	39
(一) 材料	39
(二) 载玻片和盖玻片	40
(三) 封埋剂	40
(四) 染色	42
第三节 暗视野显微镜	43
一、暗视野显微镜及其用途	43
二、暗视野显微镜的光学基础和照明特点	43
(一) 胶态体系的光学性质	43
(二) 暗视野显微镜照明的特点	44
三、暗视野显微镜的结构	45
(一) 抛物面聚光器	46
(二) 心形面聚光器	47
(三) 明暗两用聚光器	47
(四) 辉光聚光器	47
(五) 同心球面聚光器	47
四、暗视野显微镜的用法	48
第二章 活体染色	50
第一节 活体染色的定义、目的及染色机制	50
一、何谓活体染色?	50
二、活体染色与体外活体染色	51
三、活体染色的机制	51
第二节 活体染色的技术	53
一、活体染色剂的分类	53
二、染料溶液的配制和保存	54
三、染色方法	55
第三章 细胞器——线粒体和高尔基体的固定与染色法	63
第一节 线粒体的固定和染色法	63
一、固定和固定剂	63
(一) Dietrich-Parat 方法	63
(二) Regaud 方法	64
(三) Benoit 方法	65

二、包埋和切片	65
三、染色法	65
(一) 阿特曼(Altmann)氏染色法	65
(二) Regaud染色法	66
第二节 高尔基体的固定和染色法	67
一、高尔基体的固定	67
二、主要固定剂及其原理	68
(一) 硝酸银浸染法	68
(二) 四氧化锇浸染法	70
(三) 四氧化锇蒸气直接浸染法(汪德耀, 1962)	71
第四章 细胞化学	72
第一节 细胞的核酸化学方法	72
一、引言	72
二、鉴定核酸的细胞化学方法	73
(一) 鉴定核酸中的嘌呤和嘧啶的方法简述	73
(二) 鉴定核酸中 DNA 的细胞化学方法	76
(三) 孚尔根显微分光光度计的用法	84
(四) 鉴定核酸中 RNA 的细胞化学方法	89
第二节 蛋白质和氨基酸的细胞化学	94
一、总论	94
(一) 单纯蛋白质	94
(二) 结合蛋白质	94
二、方法及原理	95
(一) Millon 氏反应(Millon 1849)	95
(二) Ninhydrin(茚三酮环三酮戊醛的水合物)-Schiff 和 Alloxan(四氧嘧啶)-Schiff 法[Yasuma(安间)和 Ichikawa(市川)]	96
(三) Sakaguchi 氏反应	98
(四) 黄色蛋白反应	99
(五) -SH 基反应	99
(六) Danielli 双偶氮结合法	101
第三节 酶的细胞化学	107
一、关于酶的通论	107
(一) 酶作用的一般特性	107

(二) 酶的分类和命名简介	110
二、关于酶的细胞化学的一般应注意的问题	112
(一) 扩散及吸附现象	112
(二) 对照试验	115
(三) 固定问题	115
(四) 酶催化反应专一性的相对性问题	116
(五) 酶细胞化学的定量分析	116
(六) 简述水解酶的一些例证	117
第四节 糖的细胞化学	120
一、多糖类	121
(一) 粘多糖	122
(二) 粘蛋白和糖蛋白	123
(三) 糖脂类	124
二、糖类的细胞化学	124
(一) PAS 反应	124
(二) 过碘酸-Schiff 反应的专一性问题	125
(三) PAS 阳性物质之间的区分	126
(四) PAS 反应的原理	127
第五节 脂类的细胞化学	129
一、脂肪的分类	129
二、关于脂类物质的组织化学分析	130
三、脂类的组织化学方法	131
四、胞质反应	134
五、胆固醇和固醇	134
第五章 生物学中的放射自显影术	136
第一节 放射自显影的基本原理	136
一、基本原理	137
(一) 放射性同位素	138
(二) 乳胶	139
(三) 核子乳胶的选择	140
第二节 放射自显影的基本操作方法	141
一、宏观自显影	141
二、显微放射自显影	142
(一) 方法简介	142

(二) 操作步骤	148
三、电子显微镜放射自显影	153
(一) 电子显微镜放射自显影标本的制备	155
第六章 细胞培养	172
第一节 动物细胞的培养	172
一、组织培养及其应用	172
二、培养前的准备工作	174
(一) 器械的清洗和消毒	174
(二) 生理盐水的制备	176
(三) 培养基的制备	130
三、培养方法	190
(一) 组织块培养法	190
(二) 细胞悬液培养法	194
(三) 器官培养法	196
第二节 植物细胞融合	198
一、原生质体培养与植株的再生	198
(一) 材料的选择与酶液的制备	198
(二) 原生质体的分离与培养	199
(三) 原生质体的分裂与分化	200
二、原生质体融合	200
(一) 原生质体分离	200
(二) 原生质体融合	200
第七章 显微照相术	202
第一节 照相原理与感光材料	202
一、照相原理与相机的结构	202
(一) 照相原理	202
(二) 照相机的构造	203
二、感光材料	207
(一) 感光片的结构与性能	207
(二) 相纸的结构与性能	212
(三) 感光材料正反面的辨别	214
第二节 显微照相装置和照相程序	214
一、小型显微照相装置及操作程序	215
(一) 主要构成部件	215

(二) 去镜头的显微照相机的照相程序·····	216
(三) 带镜头的小型显微照相机的照相程序·····	217
二、带皮腔的立体和显微摄影两用机·····	218
三、曝光时间·····	219
四、放大率及测量方法·····	220
第三节 底片的冲洗和晒印放大技术·····	220
一、底片冲洗的步骤及原理·····	220
(一) 水中浸润·····	221
(二) 显影·····	221
(三) 停显·····	225
(四) 定影·····	226
(五) 水洗·····	228
(六) 晾干·····	229
(七) 其他(底片的减薄和加厚)·····	229
二、晒印与放大技术·····	230
(一) 晒印·····	230
(二) 放大·····	231
第八章 电子显微镜及其在生物学上的应用 ·····	232
第一节 电子显微镜的结构原理·····	232
一、引言·····	232
(一) 几个常用的基本概念——“分辨率”、“放大倍数”和“反差”·····	232
(二) 显微术的长度单位·····	236
二、电镜的结构原理·····	237
(一) 光学透镜与电子透镜·····	237
(二) 电镜成像原理·····	240
(三) 电镜的主要构成部件及性能·····	242
第二节 电子显微镜的发展及未来·····	250
一、电镜的发展历史·····	250
二、电镜技术的发展趋势·····	252
(一) 超高分辨本领·····	252
(二) 超高压电镜·····	253
(三) 扫描电镜(SEM)·····	253
(四) 电视电镜·····	254
(五) 透射扫描电镜(TSEM)·····	255

(六) 电镜与其他新技术的配合使用·····	255
第三节 电子显微镜在生物学上的应用·····	256
一、细胞学方面·····	257
二、病毒结构研究方面·····	257
三、叶绿体超微结构的研究·····	258
四、癌病防治研究·····	258
五、分子生物学方面·····	259
六、动物中枢神经突触等方面的研究·····	259
第九章 电镜的生物标本制备技术·····	261
第一节 超薄切片法·····	262
一、取材·····	262
二、固定和固定剂的选择·····	263
(一) 固定的意义·····	263
(二) 几种常用固定剂·····	263
(三) 缓冲液和附加液·····	265
(四) 几种常用固定液及配方·····	266
(五) 固定方法及注意事项·····	271
三、块染·····	272
四、脱水·····	273
五、渗透与聚合·····	273
六、切片·····	283
七、染色·····	293
第二节 其他制样技术·····	298
一、负染色技术·····	298
二、表面复型法·····	298
三、真空喷镀法·····	299
四、冰冻超薄切片法·····	300
五、冰冻蚀刻技术·····	300
六、电镀放射自显影术·····	301
七、抗原抗体法·····	301
第十章 实验实例·····	302
实验一、油镜的原理、使用和细胞形态观察·····	302
实验二、几种特殊光学显微镜的原理及使用的演示·····	307

实验三、液泡系(vacuome)和线粒体(mitochondria)	
的活体染色法.....	315
实验四、高尔基体(Golgi body)和线粒体(mitochondria)	
的观察.....	319
实验五、Feulgen 反应.....	321
实验六、Brachet 反应.....	326
实验七、过碘酸雪夫反应(PAS)显示糖元和其他	
多糖物质.....	330
实验八、碱性磷酸酶显示法(根据 Gomori).....	335
实验九、酸性磷酸酶显示法(Gomori 氏 1950).....	336
实验十、过氧化物酶(Peroxidase)显示法(根据	
McTunKin 1922).....	338
实验十一、快绿染色法显示细胞内碱性蛋白及酸性蛋白.....	340
实验十二、细胞放射自显影.....	341
实验十三、染色体标本制作技术.....	345
实验十四、细胞的无丝分裂(amitosis)和有丝分裂(mitosis)	
的观察.....	354
实验十五、细胞减数分裂(meiosis)和染色体的形态观察.....	356
实验十六、生物样品的超薄切片法.....	362
实验十七、参观电子显微镜.....	368
实验十八、活细胞和细胞组分的分离与纯化.....	372
实验十九、动物细胞线粒体的分离.....	374
实验二十、同功酶垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术.....	377
附录: 某些酶的同功酶显色方法.....	384
参考文献.....	386

绪 论

早在十七世纪六十年代,英国学者虎克利用简单的显微镜偶然发现了细胞,直到十九世纪三十年代末,两位德国学者施旺和施莱登共同建立了著名的《细胞学说》之后,细胞学才建立起来。

细胞学是研究生物体内细胞的结构功能与阐明细胞生命活动的发展变化规律,并且进而控制这些规律的科学,是生物科学中极其重要的基础学科。它与解剖学、组织学、胚胎学、生理学、遗传学、微生物学、生物化学、生物物理学、分子生物学和分子遗传学,以及医学、药学、免疫学和农学等学科都有广泛的而又紧密的联系。

细胞的发现,使我们认识生物界从宏观深入到了微观,借助显微镜使我们看见肉眼所看不到的世界。形形色色的千变万化的生物界在结构上的相似性和内在联系,加深了我们对于生物由简单到复杂,由低级到高级进化发展的认识,这是自然辩证法的重要证明。革命导师恩格斯把细胞学说、能量转化规律和进化论誉为十九世纪人类在自然科学方面的三大发现,不是偶然的。

一百多年以来,由于各种光学显微镜,尤其是本世纪四十年代以后,普遍应用相差显微镜和电子显微镜等观察工具以及近代化学,尤其生物化学、物理学和分子生物学等方面的理论的发展和技术方法的进步,现代的细胞学已不限于研究细胞的静态结构和表面的生理现象,而是采用各种新技术来探索细胞的生命现象和它们的变化规律。经过不断的发展,细胞学的研究已从叙述到实验,从分析到综合,从定性到定量,从局部到整体,从显微结构到亚显微结构,甚至到分子水平,把结构与功能统一起来,把形态学、生理学和生物化学联系起来,把细胞与细胞之间联系起来,进而把细胞

和活动与整个生物体的机能联系起来,这样使我们对于生物体的研究,越来越深入,获得了既精细而又比较完整的了解。近二十余年来,由于分子生物学的迅速发展,由于对物质结构的深入研究,对生命现象的认识已从细胞水平进入到亚细胞,甚至到分子水平。今天,细胞学出现一个完全崭新的面貌,已发展成为细胞生物学的新阶段。细胞学的研究正在日益深入,一日千里地向前发展着。

但是由于在十九世纪末和二十世纪二十年代,魏思曼提出的种质论和摩尔根提出的染色体-基因遗传理论之后,很多学者只片面地局限于细胞核和染色体的研究,而忽视了对细胞质、细胞器的研究,忽视了细胞质与细胞核之间的相互关系、细胞与细胞之间以及细胞与环境之间的关系的的研究,结果就使细胞学一度成为“核学”或“染色体学”的偏向。

但是,从一九三五年起,由于新技术的出现,细胞学就开始了“新生”。细胞学随着就发生了一系列“爆炸性”的革命,一九三五年可以说是细胞学的一个历史转折点,古典的细胞学从此结束了它的历史任务,细胞生物学新时代开始出现了。细胞学的这种“革新”,除了受到几种学科如物理学和化学的新成就的深刻影响,在理论方面又摆脱了“染色体学”和“核学”的影响,以及二十世纪三十年代农业生产和医学实践对于细胞学提出新的要求之外,最重要的原因就是由于新技术新方法的不断出现和发展。如果没有这些新技术和新方法,细胞学的“革新”可以说是不可能的。例如超速离心法、电子显微镜、相差显微镜结合细胞培养和加速显微电影研究活细胞、细胞化学、同位素放射自显影、荧光显微镜、细胞分光光度计、超微量分析、细胞电泳技术、X光线衍射法,以及细胞融合、核移植、花药培养和新发展的激光技术等等,使细胞学的新技术新方法不断出现,日新月异。

我们编写这本“细胞生物学实验指导”是根据1977年10月教

育部在成都召开的高等院校生物学教材会议细胞学小组决议的精神进行的。除了作为学生上实验课的技术指导之用外，主要是供讲授细胞学及细胞生物学，尤其上实验课的教师参考之用。因此，除了介绍厦门大学生物系进行细胞学及细胞生物学实验课的一些基本技术外，还着重于一些有关理论方面的阐述，以及在细胞化学“核酸”及“酶”部份我们的经验总结，以供参考。

第一章 各种光学显微镜术

显微镜是工、农业生产、医疗卫生和科学研究常用的工具，更是细胞生物学研究不可缺少的工具。

细胞的发现、细胞学说的建立和发展都是紧紧地跟显微镜的发明和改进密切相联系的，因为光学显微镜帮助人们大大地扩大了眼界，使肉眼看到了原来看不到的细胞和它的结构。

显微镜发明的三百多年来，通过不断地改进，它的装置和性能也不断提高。现在显微镜的分辨力已接近于理论数值——照明光波长的一半。并且出现适应于不同需要的各种显微镜，既能观察死的细胞，也能观察活的细胞，如相差显微镜和暗视野显微镜；既能作形态方面的观察，也能作定性的分析，如荧光显微镜；有的还可作为定量的研究，如干涉显微镜和紫外光显微镜；此外，偏光显微镜对于双折射物质构型的研究也很有用处。因此，各种光学显微镜虽然是经典的技术，迄今仍然是我们研究细胞生物学和其他科学的重要方法和手段之一。当然，由于光学显微镜的分辨极限不超过 0.2 微米，要研究更细微的结构还得借助于电子显微镜和其他方法。

第一节 复式显微镜

现代实验室经常使用的光学显微镜是由物镜、目镜和聚光器等组成的复式显微镜(狭义的显微镜)。它是从十七世纪中叶 Hooke 的原始复式显微镜发展来的。其他许多种类的显微镜经常是在此基础上，根据光学的现象和规律，适当地改装而成的，如暗视野显微镜、相差显微镜等。因此，必须首先熟悉复式显