

内 容 提 要

本书是根据全国十多所高等院校提供的资料,由兰州大学生物系细胞遗传教研室与细胞学研究室编写而成。其内容包括了一系列现代细胞生物学实验技术,涉及到细胞的形态与结构、细胞膜的渗透性、细胞器的分离与观察、染色体组型分析与分带、姊妹染色单体区分染色、细胞培养、细胞融合、早熟染色体凝集、细胞电泳、显微放射自显影与同位素技术、显微镜与显微摄影以及电镜样品制备等方面,共有三十七个实验。

本书是综合大学生物系各专业实验教材,可供师范院校、农林院校及医学院校有关专业的师生参考,对有关科研人员也颇有参考价值。

高等学校教材

细胞生物学实验

兰州大学 细胞学及遗传学教研室 主编
细胞生物学研究室

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

上海中华印刷厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 8.375 字数 200,000

1986年8月第1版 1986年9月第1次印刷

印数 00,001—5,200

书号 13010·01320 定价 1.50 元

前 言

1984年7月,在兰州大学举办了全国高等院校细胞生物学实验讲习班。北京大学、山东大学、四川大学、兰州大学、北京师范大学、华东师范大学及东北师范大学共七所高等院校,为讲习班提供了实验教材并负责实验讲授、指导工作。在讲习班结束的总结会上,讲习班的同志一致认为这次讲习班所采用的实验内容新颖,水平较高,积累了各校的经验,体现了各校的特色,对于更新现有实验内容,提高实验水平,会有很大促进作用,因而建议汇编出版。为了满足这一迫切要求,我们从讲习班上各校交流的实验教材中选择了部分内容,与本次讲习班所用教材合在一起,汇编成本教材,供高等院校细胞生物学实验使用。考虑到各校的实际情况和不同要求,书中的实验项目比较广泛,既有设备简单、方法简便的基本实验;又有要求较高、用途较广的实验。在使用本书时,各校可自行选择,灵活安排。

本书是在中国细胞生物学学会教学专业组组长、兰州大学细胞生物学研究室主任郑国锡教授的热情关怀和具体指导下,由兰州大学杨汉民同志负责汇编而成。下列同志为本书编写了部分实验:北京大学李荫蓁(实验十八)、高伟良(实验二十八);山东大学韩贻仁(实验二十一)、刘玉章(实验十九、二十六);四川大学王子淑(实验十二);兰州大学贾敬芬(实验二十三、二十四)、王义琛(实验二十五、二十七、三十七)、聂秀菡(实验三十六)、高清祥(实验十三、二十二)、刘力生(实验三十、三十一);南开大学(实验十四);武汉大学余其兴(实验八、十五);中山大学陈婉萌(实验十七);暨南大学汪引宣(实验十六);北京师范大学王永潮(实验

二十)、连慕兰(实验六、九);东北师范大学徐宗尧(实验三十二、三十三);华东师范大学黄祥辉(实验十、十一)、王耀发(实验二十九);福建师范大学傅荣典(实验七);辽宁师范学院卞小庄(实验一、二、三);北京农业大学敖明光(实验三十四、三十五);浙江农业大学王以秀(实验四、五)。在组织编写本书的过程中,还有许多同志为本书提供了宝贵的意见和建议。编者在此对以上同志表示衷心的感谢。由于篇幅的限制,许多院校具有特色的实验内容未能编入,这是非常遗憾的,有待以后修改,不断充实。

限于我们的水平和经验,书中错误和不妥之处在所难免,热忱地希望同志们批评指正。

编 者

1985年10月于兰州大学

目 录

实验一	细胞形态及大小的观测	1
实验二	细胞的显微结构——光学显微镜下的细胞	3
实验三	细胞的亚显微结构——电子显微镜下的细胞	6
实验四	细胞膜的渗透性	8
实验五	胞间连丝的观察	11
实验六	细胞器的分离	13
实验七	细胞内氧化还原酶的原位显示—— 四唑盐法显示琥珀酸脱氢酶	18
实验八	酸性磷酸酶的显示方法	23
实验九	细胞骨架的观察	26
实验十	植物细胞骨架的光学显微镜观察	31
实验十一	植物细胞原生质流动及其影响因素	33
实验十二	人体染色体标本的制备、组型分析 与分带技术	35
实验十三	人体姊妹染色单体区分染色法	48
实验十四	植物染色体结构与 Giemsa(吉姆萨) 分带技术	54
实验十五	植物姊妹染色单体区分染色法	59
实验十六	环境污水及辐射诱变染色体改组的观察	63
实验十七	染色体核仁组成区的银染法	66
实验十八	动物细胞培养	69
实验十九	动物细胞融合	82

实验二十	哺乳类细胞中早熟染色体凝集的观察·····	91
实验二十一	哺乳动物早期胚胎细胞的体外活体观察·····	95
实验二十二	植物组织和器官的培养·····	102
实验二十三	植物原生质体的分离和培养·····	109
实验二十四	用聚乙二醇法诱导植物原生质体融合·····	115
实验二十五	荧光细胞化学测定·····	118
实验二十六	细胞电泳(一)·····	126
实验二十七	细胞电泳(二)·····	140
实验二十八	显微放射自显影技术与细胞内 DNA 及 RNA 合成的标记·····	150
实验二十九	^3H 标记膜片法测定细胞 S 期的 DNA 复制·····	171
实验三十	用 ^3H 标记化合物研究细胞内 DNA、 RNA 和蛋白质代谢的动态过程·····	173
实验三十一	用磷-32-磷酸氢二钠研究细胞内 ATP 代谢的动态过程·····	178
实验三十二	显微镜及其使用·····	183
实验三十三	显微摄影术·····	198
实验三十四	DNA 的提取·····	235
实验三十五	核酸大分子的电镜观察·····	238
实验三十六	植物细胞透射电镜样品的制备·····	241
实验三十七	植物原生质体扫描电镜样品的制备·····	257

实验一 细胞形态及大小的观测

实 验 目 的

观测各种不同细胞的形态及大小,从而对细胞的分类、进化及分化有所了解。

实 验 用 品

一、器材

显微镜、测微尺。

二、材料

真核、原核细胞涂片及切片,动物和植物不同组织的切片。

实 验 方 法

一、用目镜测微尺分别在高倍镜下和油镜下测量镜台测微尺,从而算出你所用显微镜中目镜测微尺每格代表的长度。

二、用高倍镜及油镜镜检各种切片,并用目镜测微尺测量细胞和细胞核的长、短径的长度。

三、选取细胞膜和核膜界限清晰的切片或涂片供测量。测量时可旋转目镜(测微尺)及移动玻片,置被测细胞于测微尺轴线上。

四、根据测量结果计算各种细胞及细胞核的体积。

1. 椭球形:

$$V = \frac{4}{3} \pi ab^2$$

式中 a ——长半径

b ——短半径

2. 圆球形:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

式中 r ——半径

3. 圆柱形:

$$V = \pi r^2 h$$

式中 r ——半径

h ——高

作 业

一、根据观察及计算结果,填写下表(表 1-1)

表 1-1 实验结果

细 胞 名 称	形态特征	细胞体积	核 体 积	核质比例
大肠杆菌				
酵 母				
金鱼藻细胞				
变 形 虫				
蛙血细胞				
洋葱内表皮细胞				
蛙卵细胞				

二、说明在细胞分化过程中细胞核大小相对稳定的原因。

实验二 细胞的显微结构——光学显微镜下的细胞

实 验 目 的

判断和识别光学显微镜下各种细胞器的形态、大小及数目。

实 验 原 理

由于光学显微镜的最高分辨力为 $0.2\ \mu\text{m}$ ，而细胞器大部分在 $0.1\ \mu\text{m}$ 和 $10\ \mu\text{m}$ 之间，所以光学显微镜下可见到一般细胞器的外部形态。较大的细胞器如细胞核、质体等还可见到其细微结构。

细胞器往往由特殊物质组成，因而可通过对特异物质的区别染色把各种结构区别开来。每种细胞器都有特殊的形态、大小、分布位置及数目，这也是我们判断、识别细胞器的依据。而每种细胞器在不同细胞，不同发育时期和不同生理状态下的形态大小会有所不同。所以细胞器的观察可用来判断细胞的生理状态和发育情况。我们在取材和观察上也要注意各种细胞器在不同细胞中的特殊性。

实 验 用 品

一、器材

显微镜、载玻片、盖玻片、刀片、注射针头、消毒棉花。

二、试剂

Wright 染液：

Wright 粉剂

0.1 g

甲醇

60 ml

三、材料

1. 切片(见实验方法中所列)。

2. 菠菜叶片。

实 验 方 法

注意观察下列结构:

1. 细胞核及核仁:

(1) 不同细胞的核及核仁: 蚕豆根尖切片、兔肝切片(Unna 试剂染色)。

(2) 多核及多核仁现象: 蛙卵切片、鼠肝切片、肌肉切片(Unna 试剂染色)。

(3) 核形态差异: 耳垂取血, 待涂片干、Wright 染液染 5 分钟, 自来水冲洗后镜检, 注意血红细胞无核及白细胞核形态的差异。

(4) 异染色质: 观察上片中鼓槌分布情况。口腔粘膜涂片(地衣红染色)、吖啶橙染色的人血涂片(在荧光显微镜下观察)。

(5) 染色体: 洋葱、蚕豆根尖压片、蟾蜍骨髓涂片、贻贝胚胎压片、玉米花粉母细胞压片(Giemsa, 地衣红或洋红染色)。

2. 中心体: 蚰蜒精母细胞、马蛔虫受精卵、蝗虫精巢切片(巴西木素染色)。

3. 线粒体: 洋葱根尖切片、蚕豆根尖切片、兔肝切片、蚰蜒卵母细胞切片(Rubins 或苏木精染色)。

4. 叶绿体: 由菠菜叶片上剥下叶肉细胞层, 镜检, 注意类囊体形态、数目。

5. 高尔基体: 兔肝切片、牛神经切片、蚕豆根尖切片(硝酸银

或四氧化钼染色)。

作 业

1. 绘制细胞显微结构图: 把你所见到的各种细胞器绘制在一个细胞里。注意细胞器外形特点、大小、分布位置、数目。

2. 查资料回答问题:

(1) 某些细胞多核及多核仁的原因。

(2) 异染色质特点及形成原因。

实验三 细胞的亚显微结构—— 电子显微镜下的细胞

实 验 目 的

一般性了解电子显微镜的工作原理，着重判断和识别电镜下各种细胞结构。

实 验 原 理

电子显微镜是利用高速电子射线为照明源，并根据电子具波动性和粒子性，能在电场或磁场作用下改变其前进轨道的特点，利用多级电子透镜来控制电子的运动轨迹，使它产生偏转、聚焦或散射，从而通过对样品透射或反射形成疏密不同的电子放大图象，最后显示在荧光屏或记录在照相装置上。

由于电子射线波长比可见光波长约短 10 万倍，所以电子显微镜的分辨本领比光学显微镜高得多，可达 $0.2-0.3\text{ nm}$ ，因而可用于观察细胞更细微(亚显微)的结构。

实 验 用 品

电子显微镜、超薄切片、细胞亚显微结构照片。

实 验 方 法

- 一、听取专门技术人员讲解电镜工作原理、结构及使用方法。
- 二、听取教师介绍电镜制片技术。
- 三、参观电子显微镜，观察细胞亚显微结构(实际观察及看照片)。

作 业

根据观察结果及理论课所学内容绘图并填表。

一、绘制细胞亚显微结构图。

二、填表

表 8-1 细胞器名称及结构特征

细 胞 器 名 称	显微结构特征	亚显微结构特征
质 膜		
细胞连接		
核 膜		
内 质 网		
高尔基体		
液 泡		
溶 酶 体		
微 体		
线 粒 体		
质 体		
核 仁		
染 色 体		
中 心 体		

实验四 细胞膜的渗透性

实 验 目 的

了解细胞膜的渗透性及各类物质进入红细胞的速度。

实 验 原 理

红细胞放置在数种等渗溶液中, 根据红细胞对各种溶质的透性不同, 有的溶质可渗入, 有的溶质不能渗入。渗入红细胞的溶质能提高红细胞渗透压, 使水进入红细胞, 引起溶血。

由于溶质透入速度不同, 溶血时间也不同。

实 验 用 品

一、器材

50 ml 小烧杯、10 ml 移液管、试管(1×10 cm)、试管架。

二、试剂

0.17 mol/L 氯化钠、0.17 mol/L 氯化铵、0.17 mol/L 醋酸铵、0.17 mol/L 硝酸钠、0.12 mol/L 草酸铵、0.12 mol/L 硫酸钠、0.32 mol/L 葡萄糖、0.32 mol/L 甘油、0.32 mol/L 乙醇、0.32mol/L 丙醇。

三、材料

羊血。

实 验 方 法

一、羊红细胞悬液

取 50 ml 小烧杯一只,加一份羊血和十份 0.17 mol/L 氯化钠溶液,形成一种不透明的红色液体,此即稀释的羊血。

二、低渗溶液

取试管一支加入 10 ml 蒸馏水,然后再加入 1 ml 稀释的羊血,注意观察溶液的颜色变化,由不透明的红色逐渐澄清,红细胞发生破裂,造成 100% 红细胞溶血,使光线比较容易透过溶液。

三、羊红细胞的渗透性

1. 取试管一支,加入 0.17 mol/L 氯化钠溶液 10 ml,再加入 1 ml 稀释的羊血,轻轻摇动,注意是否有颜色变化? 是否有溶血现象? 为什么?

2. 取试管一支,加入 0.17 mol/L 氯化铵溶液 10 ml,再加入 1 ml 稀释羊血,轻轻摇动,注意是否有颜色变化? 是否有溶血现象? 若发生溶血,记下时间(自加入 1 ml 稀释羊血到溶液变成红色透明澄清所需时间)。

表 4-1 不同低渗溶液下的溶血现象

试 管 编 号	是否溶血	时 间	结果分析
(1) 10ml氯化钠+1ml稀释羊血			
(2) 10ml氯化铵+1ml稀释羊血			
(3) 10ml醋酸铵+1ml稀释羊血			
(4) 10ml硝酸钠+1ml稀释羊血			
(5) 10ml草酸铵+1ml稀释羊血			
(6) 10ml硫酸钠+1ml稀释羊血			
(7) 10ml葡萄糖+1ml稀释羊血			
(8) 10ml甘 油+1ml稀释羊血			
(9) 10ml乙 醇+1ml稀释羊血			
(10) 10ml丙 醇+1ml稀释羊血			

3. 分别在下列八种等渗溶液中进行实验, 步骤同 2。

(1) 0.17 mol/L 醋酸铵 (2) 0.17 mol/L 硝酸钠

(3) 0.12 mol/L 硫酸钠 (4) 0.12 mol/L 草酸铵

(5) 0.32 mol/L 葡萄糖 (6) 0.32 mol/L 甘油

(7) 0.32 mol/L 乙醇 (8) 0.32 mol/L 丙醇

实 验 结 果

将观察到的现象记录, 并进行分析和比较。(表 4-1)

实验五 胞间连丝的观察

实 验 目 的

观察植物细胞间的胞间连丝,进一步认识细胞并不是“独立王国”,而是与周围细胞有着千丝万缕的联系。胞间连丝为细胞间的物质运输与刺激传递起着桥梁作用。

实 验 用 品

一、器材

显微镜、载玻片、盖玻片、小刀、刀片、镊子、剪刀、温箱。

二、试剂

硝酸银、福尔马林、二甲苯、中性树胶。

三、材料

柿种子、红辣椒。

实 验 方 法

一、柿胚乳细胞永久片制作

1. 取柿种子,用小刀剥去种皮,将胚乳横切成3—4小块。

2. 将整体小块投入硝酸银饱和溶液和甲醛(市售福尔马林)各半的混合液中,置暗处1—2周,就能起到使细胞壁膨胀,蛋白质凝固和染色三种作用。

3. 取出小块,用清水洗净,徒手切片,刀口要和柿胚乳小块平行,切面与柿种子长轴垂直。

4. 将切成的薄片,用纸包好,置于恒温箱中(35—40℃)烘干。

5. 选取干燥了的薄片, 浸在二甲苯中透明 1—2 分钟, 然后用中性树胶封固、镜检。

二、红辣椒表皮细胞临时制片

剪取一小块红辣椒, 用小刀小心刮除果肉, 留下一层极薄的表皮, 放在载玻片上, 滴一滴水, 盖上盖玻片后即可观察。镜检时光线不要太亮。

三、玉米籽粒糊粉层临时制片

玉米籽粒(颖果)浸泡在水中一天, 用镊子剥去表皮露出糊粉层, 制作徒手切片。制作时刀口与糊粉层平行, 把切成的薄片放在培养皿内的清水中, 挑取较好的切片放在载玻片上, 加一滴清水, 盖上盖玻片后即可观察, 如加番红液则效果更好。

作 业

绘图示柿胚乳细胞、辣椒表皮细胞及玉米籽粒糊粉层细胞间的胞间连丝。