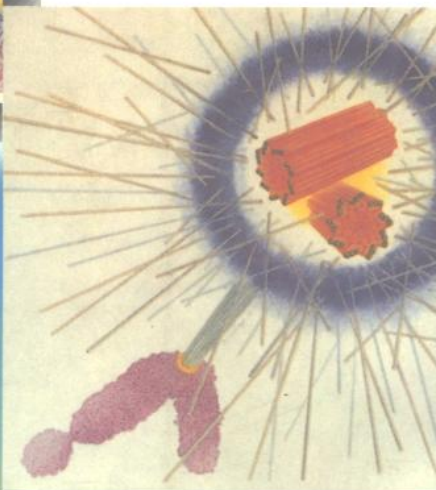
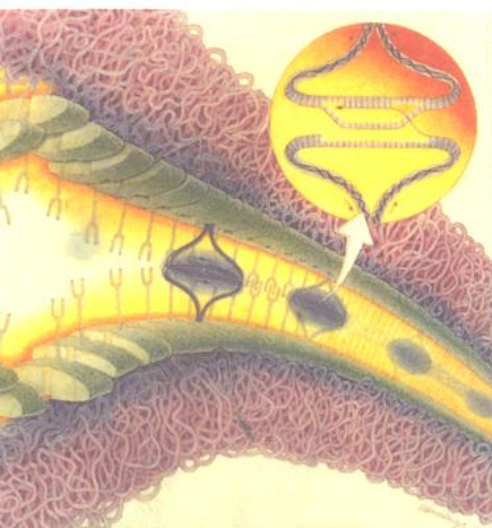


细胞生物学实验

蒋亚林
陆寿珍
沈大稜
编 著



复旦大学出版社

58.157

718

细胞生物学实验

蒋亚林 陆寿珍 沈大稜 编著

3k603/26



复旦大学出版社

责任编辑 蔡武城

责任校对 马金宝

细胞生物学实验

蒋亚林 陆寿珍 沈大稜 编著

出 版 复旦大学出版社

(上海国权路 579 号 邮政编码 200433)

发 行 新华书店上海发行所

印 刷 上海译成印刷厂

开 本 850×1168 1/32

印 张 7.75

字 数 228,000

版 次 1996 年 7 月第 1 版 1996 年 7 月第 1 次印刷

印 数 1—2 000

书 号 ISBN7-309-01612-2/Q·47

定 价 11.00 元

内 容 提 要

本书含显微镜技术、细胞组织化学技术、细胞培养技术、细胞组分分离技术、同位素技术、细胞工程技术和其他技术(细胞动力学、同工酶、相关免疫学、原位杂交、暗室技术),包括 44 个实验。它包含两个层次的内容,即细胞生物学的基本技术和近年来细胞生物学研究中发展起来的新技术,适于作为大学必选课“细胞生物学实验”和研究生选修课“细胞生物学研究方法”的教学参考书,也可作实验技术手册使用。

序

细胞生物学是高等院校生物类专业的重要基础课程之一。据我所知,目前,我国已有好几个版本的细胞生物学教材,但适合于高等院校不同层次学生用的细胞生物学实验技术类书籍尚是空白。因此,像我这样的生物学战线上的老兵,一直期待着细胞生物学实验技术类书籍能早日问世。

复旦大学生命科学学院遗传学和遗传工程系的沈大稷等老师,在多年的细胞生物学教学实践中,终于把细胞生物学的实验技术汇编成书出版了,这无疑是细胞生物学教材建设中的一件十分有意义的好事。

我浏览了全书的目录,也阅读了有关章节。在这本书中既有基础性的显微镜技术,也有细胞免疫、原位杂交等新技术。我认为,这本书既可作为大学本科生的学习用书,也可供研究生的选修用书。由于本书每个实验技术都有设计原理和该项技术的发生、发展的轨迹,因此,对从事有关生命科学研究工作的人员将会有很好的启迪作用。此外,对从事细胞生物学研究的科研工作者来说,本书又不失为是一本很好的实验手册。

由于细胞生物学本身处于迅速发展之中,编著者也仅有自己的教学和科研实践,因此,我相信本书在全国同仁的关怀、帮助下,将会不断完善、提高。我衷心祝愿这本书能在全国有真知灼见的同行爱护下,不断取得新的进步,成为全国同行所欢迎和公认的实验技术类教学用书。

沈大稷
1994.7.9

43782

前 言

近年来,国际上细胞生物学基础研究和实验技术发展迅速,这些研究和技术已经渗透到生命科学的有关各学科,也影响到工、农、医等其他领域。细胞生物学的基础课和实验课已成为世界各理科大学生命学科的必修课,医药、农林和师范院校也纷纷将此课程定为必修课或选修课。国家教委明确规定细胞学为生物学系的六大基础课(生物化学、细胞学、遗传学、微生物学、动物学和植物学)之一。

多年的教学使我们发现,国内外有关基础理论的专著或教科书都出得比较快、比较多;相对而言,反映实验技术的书籍则比较少,反映实验技术新发展的教材就更少了。这就鞭策和鼓励我们自己来编写。

本实验技术是在1980年以来每年向我校生命科学学院三年级学生开设的“细胞生物学实验”课和近10年来向研究生开设的“细胞生物学研究方法”课的基础上,并吸收了国内外近年来在细胞生物学科学研究中新发展起来的实验方法编写而成的。其目的是使本书既可以作教材,又可以作实验技术手册;为此,我们采用一些不同于一般实验教材的编写方法,使本书有如下特点。

1. 除第七章之外,各章都是分别介绍同一类的实验技术。各章均编有总论部分和实验实例部分。读者可以从总论部分中了解某一类实验技术的发明和发展、应用范围和最新趋势等。这有利于读者在比较全面地理解某一技术设计原理基础上独立设计实验,并用好这一类技术。实验实例是使学习者能通过实际操作更好地掌握这一类技术。

2. 把不同水平教学内容及实验技术组合在一本书中。这样做的是使本书有多种用途,既可作本科生教材,又可作研究生教材,还可作实验室手册;不仅是为了适应不同层次的教学内容的需要,也是为了适合具有不同设备条件的实验室或课题组的需要。根据我们的教学经

验,本书中有 14 个实验,即实验 1—5、14、18、20、21、24、26、32—34 是适用于本科生的;有 8 个实验,即实验 10、13、20—25 是适用于研究生的。其他为新实验方法,可供教学参考或研究者选用。

全书编写的分工是:蒋亚林负责编写各章的基础理论(总论)部分,并编写大部分适合本科生必修或选修的实验、部分新实验技术等;陆寿珍编写实验 12、13、20—25、35、37、42 等 11 个适用于研究生选修的实验或医学细胞生物学的实验;沈大稜编写实验 9、30、31、43 和 44 等细胞生物学近年来新技术实验,并组织全稿和全面进行统稿和审校工作。

沈大稜

1994 年 6 月于复旦大学

目 录

第一章 显微镜技术	1
一、光学显微镜.....	1
(一) 光学原理 (二) 基本结构 (三) 显微镜的性能 (四) 照明方法 (五) 显微镜的使用 (六) 显微测量(附:扫描分光光度计及图像分析仪在生物学和医学中的应用) (七) 显微摄影(附:彩色显微摄影) (八) 显微录像	
二、各类光学显微镜	25
(一) 暗视野显微镜 (二) 相差显微镜 (三) 荧光显微镜 (四) 偏光显微镜 (五) 干涉显微镜 (六) 体视显微镜 (七)倒置显微镜 (八) 共聚焦显微镜	
三、电子显微镜	33
(一) 透射电子显微镜 (二) 超高压电子显微镜 (三) 扫描电子显微镜 (四) 电视电子显微镜 (五) 透射扫描电子显微镜 (六) 扫描隧道电子显微镜	
四、质子显微镜	38
实验一 光学显微镜下的细胞和细胞器及其显微测量	39
实验二 暗视野和相差显微镜的使用及其对胞质环流的观察	40
实验三 植物细胞骨架的光学显微镜观察	42
实验四 植物细胞有丝分裂各期染色体形态分析及显微摄影(附:一种新的植物染色体染色方法).....	44
实验五 植物姊妹染色单体区分染色法	46
实验六 X、Y 染色质检查(附:X-染色质的硫堇显色)	48
实验七 骨髓细胞染色体标本的制备	50
实验八 人类染色体高分辨显带	52

实验九 植物染色体高分辨率显带技术	54
实验十 染色体核仁组成区的银染	56
实验十一 人体姊妹染色单体区分染色	57
实验十二 用测微荧光法定量细胞 DNA	59
实验十三 用图像分析仪测定细胞几何参数	61
第二章 细胞组织化学技术	63
一、显微标本的制作	63
(一) 光学显微镜切片制作技术 (二) 电子显微镜切片	
制作技术 (三) 冰冻切片技术	
二、显微标本的染色	76
(一) 活体染色 (二) 固定染色 (三) 超薄切片的染色	
实验十四 DNA 的细胞化学——Feulgen 法	84
实验十五 RNA 的细胞化学——Brachet 染色法	86
实验十六 线粒体的固定和染色	88
实验十七 高尔基体的固定和染色	89
实验十八 碱性磷酸酶的定位	90
实验十九 小鼠腹腔巨噬细胞的酸性磷酸酶显示	92
第三章 细胞培养技术	94
一、动物细胞培养	94
(一) 体外培养细胞的性质 (二) 培养条件 (三) 培养方法	
(四) 冻存方法 (五) 单细胞的获得及细胞计数 (六) 常规准	
备工作	
二、动物细胞融合技术	106
(一) 融合的细胞 (二) 融合剂 (三) 杂种细胞的选择	
(四) 杂交瘤与单克隆抗体	
三、染色体分析技术	110
(一) 标本制备 (二) 植物细胞染色体制片 (三) 分带技术	
(四) 组型分析	
四、植物细胞培养	115

(一) 激素条件 (二) 原生质体培养 (三) 原生质体融合
(四) 植物细胞固定化生产技术

实验二十	哺乳类动物离体贴壁细胞的传代培养·····	118
实验二十一	细胞的原代培养·····	120
实验二十二	细胞的冻存与解冻·····	122
实验二十三	细胞培养物中支原体污染的检测·····	125
实验二十四	贴壁细胞集落形成率的测定·····	127
实验二十五	细胞转化·····	129
实验二十六	细胞骨架的免疫荧光方法显示·····	131
实验二十七	胡萝卜韧皮部愈伤组织诱发培养·····	133
实验二十八	胡萝卜细胞悬液的制备及悬浮培养·····	135
实验二十九	平板法培养胡萝卜单细胞·····	136
实验三十	植物细胞原生质体的制备与培养·····	137
实验三十一	植物体细胞杂交·····	139

第四章 细胞组分分离技术····· 142

一、离心的原理和方法····· 142

(一) 差速离心 (二) 密度梯度离心

二、离心机的使用(附:Hitachi 高速冷冻离心机的使用)····· 147

实验三十二 密度梯度离心法提取叶绿体····· 149

实验三十三 差速离心法提取线粒体及线粒体的 活体染色····· 151

实验三十四 细胞组分的分离(附:更精致的分离方案)····· 152

第五章 同位素技术····· 156

一、放射自显影的基本原理····· 156

(一) 常用的放射性同位素 (二) 乳胶 (三) 自显影的 有效率与分辨率

二、放射自显影的基本操作····· 159

(一) 显微放射自显影方法 (二) 电子显微镜放射自显影方法

三、放射性同位素的卫生防护.....	162
四、液体闪烁测量技术.....	163
(一) 液体闪烁样品制备 (二) 样品的测量 (三) 测量中的猝灭及其校正	
实验三十五 细胞放射自显影.....	165
实验三十六 染色体半保留复制的放射自显影测定.....	167
实验三十七 用液体闪烁计数法快速测定细胞非预定期DNA合成	169
第六章 细胞工程技术.....	173
一、细胞拆合技术.....	173
(一) 物理拆合法 (二) 化学拆合法	
二、染色体导入技术.....	177
(一) 小细胞介导的染色体转移 (二) 人体中期染色体分离技术	
三、基因转移技术.....	178
(一) 细胞融合法 (二) 染色体介导法 (三) 红细胞血影转移法 (四) 脂质体介导转移法 (五) DNA 介导的基因转移 (六) 微注射技术(附:培养细胞的显微注射) (七) 细胞器介导的基因转移	
四、胚胎培养及其相关技术.....	189
(一) 胚胎培养 (二) 胚胎移植 (三) 无性繁殖 (四) 嵌合体技术	
实验三十八 单克隆抗体的产生:杂交瘤融合	191
实验三十九 培养细胞 NIH 3T3 的显微注射	194
第七章 其他技术.....	197
一、细胞动力学技术.....	197
(一) 细胞分裂同步化 (二) 细胞周期时相分析 (三) 诱导早熟染色体凝集	
二、同工酶技术.....	201
三、相关免疫学技术.....	202

(一) 细胞免疫体外试验	(二) 免疫荧光技术	(三) 免疫酶技术	(四) 放射免疫分析	(五) 免疫电泳技术	
四、原位杂交技术					207
五、暗室技术					208
(一) 暗室摄影	(二) 底片冲洗	(三) 印相技术(附:制作调蓝幻灯片)	(四) 扩印		
实验四十	细胞膜的渗透性				211
实验四十一	细胞的凝集反应				213
实验四十二	染色体早熟凝集实验				214
实验四十三	植物细胞材料的同工酶技术				216
实验四十四	原位杂交法定位基因在染色体上的位置				219
附录					223
一、一般光学显微镜镜头标志					223
二、常用生物固定液					224
三、常用生物染色剂					225
四、常用缓冲液					226
五、细胞培养用液					228
(一) 动物细胞培养液					228
(二) 植物组织和细胞培养液					230
六、封片剂与粘贴剂					231
(一) 封片剂					231
(二) 粘贴剂					231
七、洗液的配制					232
八、显影液、定影液的配制					232
主要参考文献与书目					233

第一章 显微镜技术

一、光学显微镜

细胞的发现与光学显微镜的发明是分不开的。显微镜是在人们认识到凸透镜放大作用的基础上发明的。据历史记载,12世纪阿拉伯人阿尔海琴(Alhagen)就会磨制透镜。据说1604年荷兰眼镜商詹森(Z. Jansen, 1588—1628)创造了第一台放大率不超过10倍的复式显微镜,而近代显微镜的原型可能是1628年前后由舒纳(C. Scheiner)在开普勒(J. Kepler)1611年所设计的基础上制造出来的。

半个多世纪后,英国物理学家胡克(R. Hooke, 1635—1703)创制了第一架具有科学研究价值的显微镜,首次观察了木栓的显微图像,发现了细胞。真正观察到活细胞的是荷兰科学家列文虎克(Antonie Van Leeuwen Hoek, 1632—1723),他用自制的显微镜观察到了池塘水中的原生动物,还有人和哺乳类动物的精子、细菌等。

以后,荷兰的惠更斯(C. Huygens)制造了简单而有效的二透目镜,并以他的名字命名,沿用至今。在18—19世纪,欧洲不少科学家相继设计了反射镜、消色差物镜、数值孔径高的物镜、油浸物镜、补偿目镜、暗视野聚光器、偏光附件等光学显微镜头,使显微镜的性能不断得到改进和提高。在显微镜史中最著名的是德国的阿贝(Ernst Abbe),他发表的有关放大理论的重要论文奠定了显微镜的理论基础,对光学玻璃、光具和显微镜的设计和改进行有突出的贡献。

20世纪初,欧洲科学家又相继发明了双目显微镜、相差显微镜。

显微镜的种类很多,一般可分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。光学显微镜又可分为单式显微镜和复式显微镜。非光学显微镜目前是指电子显微镜和质子显微镜。

就复式显微镜来说,可分为可见光显微镜和不可见光显微镜。

可见光显微镜是利用光谱的可见光部分(380—780nm)成像的显微镜。其中,根据显微镜的照明技术可分为明视野显微镜、暗视野显微镜和荧光显微镜等;根据显微镜的成像技术可分为相差显微镜、干涉显微镜、微分干涉反差显微镜和偏光显微镜等;根据显微镜的镜体构造可分为倒置显微镜、实体显微镜和比较显微镜等。近年来,又制造出了激光扫描显微镜等。

不可见光显微镜可以分为紫外光显微镜(380nm 以下的紫外光)、红外光显微镜(780nm 以上的红外光)和 X 射线显微镜等。

随着与多种电子仪器如图像仪、电子计算机等联机使用,显微镜的使用效率也大为提高,因而光学显微镜仍然是从事细胞生物学研究必不可少的工具。

(一) 光学原理

1. 单式显微镜的光学原理

单式显微镜,即通常称的放大镜,其放大倍数常在 10 倍以下,由一个透镜构成,构造稍复杂的为解剖放大镜,其放大倍数在 200 倍以下,由几个透镜组成。

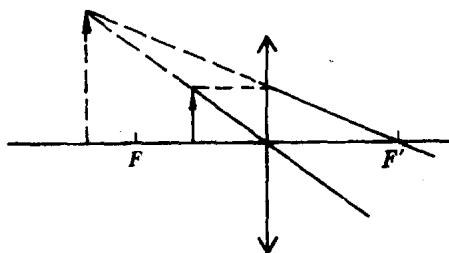


图 1-1 放大镜的成像

放大镜的放大原理如图 1-1 所示。若将物体置于透镜与焦点 F 之间,则从物体过来的光线,通过透镜后将在相反方向(物体的同一边)造成一个放大而直立的虚像,若眼睛在 F' 处观察,即可看到这个放大的像。

2. 复式显微镜的光学原理

复式显微镜是实验室中常用的显微镜,结构较复杂,放大倍数也高,由两组以上的透镜所组成,主要部分包括物镜、目镜和聚光器等光学系统。

复式显微镜的成像原理如图 1-2 所示。物体是置于聚光器与物镜之间，平行的光线自反射镜折入聚光器，经聚光器穿过透明的物体进入物镜，即在目镜的焦点平面（光阑部位或在它的附近）形成一个最初倒置的实像。从最初倒置的实像射过来的光线，经过目镜的接目透镜而到达眼球。这时的光线已成平行或接近平行。这些平行光线透过眼球的水晶体就在视网膜上形成了一个直立的实像。

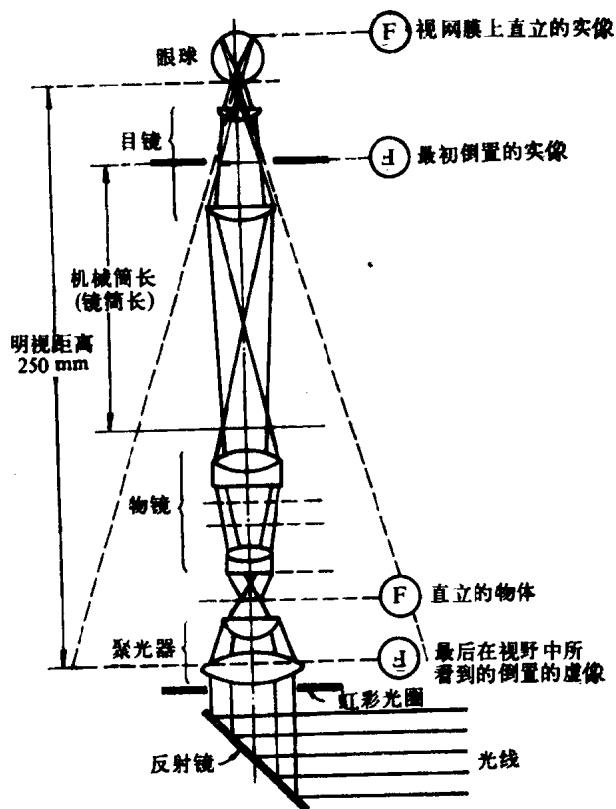


图 1-2 复式显微镜的成像(引自郑国锷)

行光线透过眼球的水晶体就在视网膜上形成了一个直立的实像。这样，眼球就成为显微镜系统的一个组成部分了。这时，我们在显微镜中所看到的是放大的倒置的虚像，与视网膜上所造成的实像是相吻合的。

从眼球的水晶体到放大的虚像之间的距离叫做明视距离，它的长度为 250mm，这是明察显微镜中物像最适宜的距离。

(二) 基本结构

显微镜的种类虽然繁多，然而它的基本结构都大致由三部分组成：光学放大系统、机械系统和光源系统。参见图 1-3。

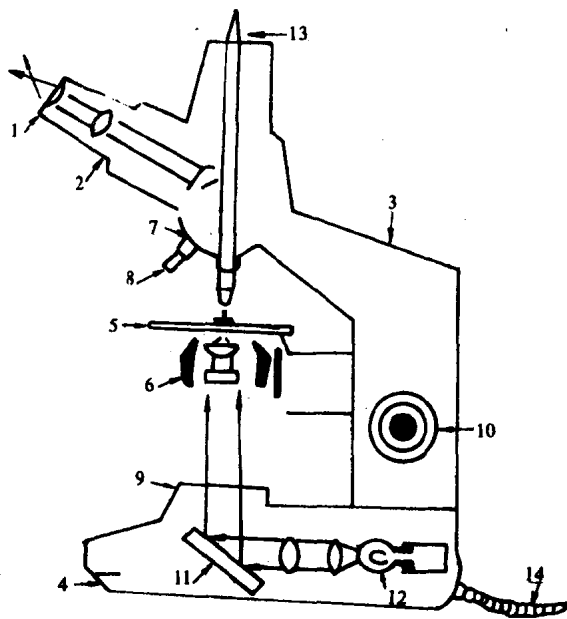


图 1-3 显微镜的结构

1. 目镜 2. 镜筒 3. 镜臂 4. 底座 5. 载物台 6. 聚光器 7. 物镜转换器 8. 物镜 9. 光阑 10. 粗、细调节器螺旋 11. 反光镜 12. 灯 13. 摄影目镜 14. 电线

到物镜转换器旋口下端的距离称为镜筒长度,新式显微镜的镜筒长度不能变更,一般是160mm,也有170mm的,其数值标在物镜筒上。

载物台上装有片夹和标本移动器,后者还附有横纵轴的标尺,便于测量标本的大小和检索被检部分(类同坐标搜寻)。

调节器分为粗调(coarse adjustment)和微调(fine adjustment),装在镜臂上,并标有刻度。好的显微镜的粗细调是共轴的。内圈是微调,读数每格一般为1—2nm;外圈是粗调。有的显微镜在调节器旁边装有保险装置,可避免物镜与玻片碰撞。

双筒式目镜其两筒之间的距离可以调节,以适应各人的瞳间距。为了保持瞳间距变化时镜筒长度不变,显微镜常附设自动伸缩装置。双筒目镜还可进行曲光度调节,以适应两眼不同的视力。

1. 机械部分

它是用于光学系统的支承和运动,并通过它调节光学系统的正确位置,只有牢固又精密的机械装置才能保证光学系统充分发挥作用。机械系统主要包括底座(base)、镜臂(arm)、载物台(stage)、物镜转换器(adoptor)、镜筒(tube)、调节器(focus adjustment)等。

镜筒有直式、斜

式、单筒、双筒、三筒之分。从目镜筒上缘

到物镜转换器旋口下

端的距离称为镜筒长度

,新式显微镜的镜筒长度

不能变更,一般是

160mm,也有170mm的

,其数值标在物镜筒上。

载物台上装有片夹和标本

移动器,后者还附有横纵轴

的标尺,便于测量标本的大

小和检索被检部分(类同坐

标搜寻)。

调节器分为粗调(coarse

adjustment)和微调(fine

adjustment),装在镜臂上,

并标有刻度。好的显微镜的

粗细调是共轴的。内圈是微

2. 光学部分

(1) 物镜(objective lens)

物镜的种类繁多。就其倍数来讲,有低倍、中倍、高倍之分;按其所用的空间介质来讲有干燥和浸液之分;按其物像校正情况来讲又分为消色差物镜、半复消色差物镜、复消色差物镜和平场物镜。

透镜的成像除了像的位置、大小、倒正、虚实以外,还有像的质量问题。

常见的一种缺陷为球面差,它是因为通过透镜边缘的光线和通过中部的光线所成的像不在一个平面上所造成的。凸透镜的球面差是负的,而凹透镜的球面差是正的,因此可用正负不同球面差的透镜结合来校正光学系统的球面差。

色差也是透镜的一大缺点,它发生在以多色光素组成的光源为照明的场合下,由于光波波长各异,不仅成像不在同一平面上,而且边缘带有色彩。纠正的办法是采用单色光、组合凹凸透镜、使用光阑遮拦造成色差最严重的透镜边缘部分。还有就是使用折射率不同的玻璃。消色差物镜(achromatic objective)是用含铅的火石玻璃的单凹透镜与含钙的冕牌玻璃双凸透镜粘合而成的,可使红、蓝两色光线的焦点互相重合,但不能使所有可见光线的焦点都汇合在一起。半复消色差物镜(semiapochromatic objective)是用萤石制造的透镜,透镜数目比复消色差物镜少而比消色差物镜多,能矫正一定的色差和球面差,英文标记为 FLUO Senipo 字样,使用时与补偿目镜匹配。复消色差物镜(apochromatic objective)是由几组透镜所构成的物镜,既能消除色差又能消除球面差,这种物镜不仅可使红、绿、蓝三种光线的色差消除,还能消除红、绿的球面差;使用复消色差物镜一定要与补偿目镜相匹配,以矫正一部分像场弯曲,同时适用于在任何色光下或加用各色滤光镜下的摄影;复消色差物镜常在其金属外壳上标有 APO 字样。平场物镜(plan objective)矫正了由消色差物镜再产生的像场弯曲,在同样倍数下,有效影像要比一般物镜的影像稍大,平场消色差物镜的金属外壳上标有 Plan 或 Plan Ach 字样。

透镜的其他缺点还有慧星差、像散、像场弯曲和畸变等,也都有一