

高等医学院校实验教材

医学细胞生物学

实验教程

主编 王 玉
潘洪明
郑立红

北京大学医学出版社

高等医学院校实验教材

医学细胞生物学实验教程

YIXUE XIBAOSHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

主 编 王 玉 潘洪明 郑立红
编 者 刘 枫 岳丽玲 陈 平
于海涛 朴贤玉 王 璐
主 审 张淑玲

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学实验教程/王玉, 朴贤玉,
王璐主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2007. 6
ISBN 978-7-81116-251-6

I. 医… II. ①王…②潘…③郑… III. ①人体细胞学:
细胞生物学—实验—教材
IV. R329. 2-33 R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 039762 号

医学细胞生物学实验教程

主 编: 王 玉 潘洪明 郑立红

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京地泰德印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 安 林

责任校对: 王怀玲

责任印制: 郭桂兰

开 本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 8

字数: 202 千字

版 次: 2007 年 9 月第 1 版 2007 年 9 月第 1 次印刷

印数: 1-5000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-251-6

定 价: 13.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

《医学细胞生物学实验教程》是由齐齐哈尔医学院、哈尔滨医科大学、佳木斯医学院、牡丹江医学院共同组织编写的。本书依据高等医学院校医学生的培养目标所需要的基本理论和基本技能的要求，根据本课程的教学性质和教学实践，并在我室原有的实验教学内容的基础上，加强和充实了设计性和综合性实验，以提高学生的动手能力及发现问题、分析问题、解决问题的能力，为以后从事生物学相关的科研和教学工作奠定坚实的研究基础。

该书可供高等医学院校本、专科和中等卫生学校各专业学生学习医学细胞生物学使用，也可供广大的医务工作者学习参考。

由于编者水平和经验有限，本教材一定还有很多缺点和错误，敬请使用者批评指正。

编者

2007年7月

目 录

实 验 一	光学显微镜的构造和使用方法	1
实 验 二	动物细胞的显微测量	7
实 验 三	细胞内糖原、蛋白质及核酸的显示	9
实 验 四	细胞器的光镜观察	13
实 验 五	细胞组分的分级分离	18
实 验 六	细胞器电镜图片观察与分析	20
实 验 七	细胞骨架的观察	23
实 验 八	细胞有丝分裂的制片及观察	26
实 验 九	细胞减数分裂的制片及观察	30
实 验 十	动物骨髓细胞染色体的制备与观察	34
实 验 十 一	绒毛细胞染色体标本的制备与观察	38
实 验 十 二	光镜切片标本的制作	40
实 验 十 三	电子显微镜样本的制备	44
实 验 十 四	电子显微镜的结构和使用	47
实 验 十 五	细胞的原代培养和传代培养	51
实 验 十 六	培养细胞的冻存、复苏与运输	54
实 验 十 七	Western blot	57
实 验 十 八	总 RNA 提取	60
实 验 十 九	RT - PCR	66
实 验 二 十	琼脂糖凝胶电泳	68
实 验 二 十 一	E. coli 感受态细胞的制备和转化	71
实 验 二 十 二	细胞癌基因转染技术	74
实 验 二 十 三	细胞融合	77
实 验 二 十 四	体外培养细胞的计数、测量与死活鉴别	80
实 验 二 十 五	培养细胞的分裂指数和集落形成率的测定	83
实 验 二 十 六	体外培养细胞的转化	85
实 验 二 十 七	显微摄影技术	89
实 验 二 十 八	酶联免疫吸附测定法	95
实 验 二 十 九	流式细胞术的原理及其应用	101
实 验 三 十	免疫荧光抗体法检查细胞表面抗原	104
实 验 三 十 一	银染核仁形成区电镜标本制备及观察	106
附 录 1	常用溶液的配制	109
附 录 2	常用仪器的使用方法与保养	116

实验一 光学显微镜的构造和使用方法

【实验目的】

1. 熟悉光学显微镜各部分的结构和用途，掌握显微镜维护的基本知识。
2. 初步掌握低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。

【实验用品】

1. 材料：羊毛装片、血涂片、字母装片、兔脊神经节切片。
2. 器材：显微镜、擦镜纸、载玻片、香柏油、二甲苯。

【实验内容与方法】

一、显微镜的构造

显微镜是一种复杂的光学仪器。它是医学实验常用工具之一，其作用是将观察的标本放大，以便观察和分析。

一般光学显微镜包括机械装置和光学系统两大部分，如图 1-1 所示。

(一) 机械装置

1. 镜座：位于最底部的构造，为整个显微镜的基座，用以支持着整个镜体，起稳固作用。

2. 镜柱：为垂直于镜座上的短柱，用以支持镜臂。

3. 镜臂：为支持镜筒和镜台的呈弓形结构的部分，是取用显微镜时握拿的部分。镜筒直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节，可使镜筒向后倾斜一定角度以方便观察，但使用时倾斜角度不应超过 45° ，否则显微镜由于重心偏移容易翻倒。

4. 调节器：也称调焦螺旋，为调节焦距的装置，位于镜臂的上端（镜筒直立式光镜）或下端（镜筒倾斜式光镜），分粗调节器（大螺旋）和细调节器（小螺旋）两种。粗调节器可使镜筒或镜台作较快或较大幅度的升降，能迅速调节好焦距，适于低倍镜观察时调焦。细调节器可使镜筒或镜台缓慢或较小幅度地升降，使用于在低倍镜下用粗调节器找到物体后，在高倍镜和油镜下进行焦距的精细调节，藉以对物体不同层次、深度的结构做细致地观察。

5. 镜筒：位于镜臂的前方，它是一个齿状脊板与调节器相接的圆筒状结构，上端装载目镜，下端连接物镜转换器。根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种，镜筒直立式光镜的目镜与物镜的光轴在同一直线上，而镜筒倾斜式

光镜的目镜与物镜的中心线互成 45° 角，在镜筒中装有使光线转折 45° 的棱镜；双筒式光镜的镜筒均为倾斜式的。

6. 物镜转换器：又称旋转盘，位于镜筒下端的一个可旋转的凹形圆盘上，一般装有 2~4 个放大倍数不同的接物镜。旋转它就可以转换接物镜。旋转盘边缘有一定卡，当旋至物镜和镜筒成直线时，就发出“咔”的响声，这时方可观察玻片标本。

7. 镜台：也称载物台，是位于镜臂下面的平台，用以承放玻片标本。载物台中央有一圆形的通光孔，光线可以通过它由下向上反射。

8. 标本推进器：位于镜台的后方或侧面边缘，连一可动弧形弹簧夹。其上方或下方一侧有两个旋钮，转动旋钮可调节推进器，使玻片标本前后或左右移动。

标本推进器上有纵横游标尺，用以测定标本在视野中的方位及其大小。游标尺一般由主标尺 (A) 和副标尺 (B) 组成。副标尺的分度为主标尺的 $9/10$ 。使用时，首先看副标尺的 0 点位置。然后看主、副标尺的一致点。如图 1-2 所示，副标尺的 0 点主标尺的 26 与 27 之间，副标尺的 3 与主标尺的 29 一致，则此标尺所表示的数值为 26.3mm。

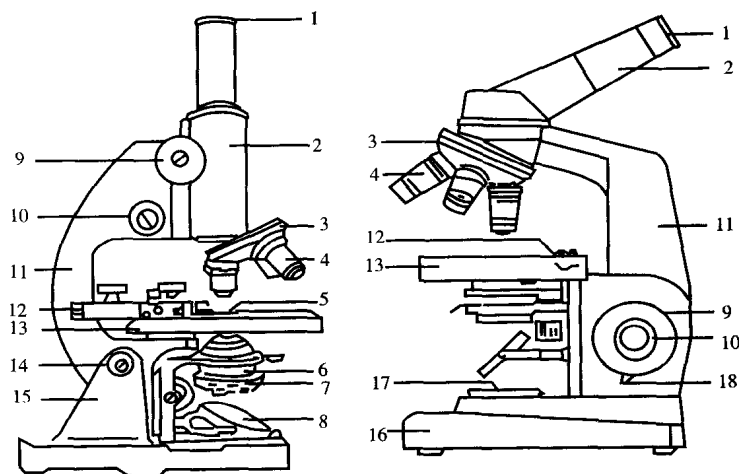


图 1-1 显微镜的结构

1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜 5. 通光孔 6. 聚光器 7. 光圈 8. 反光镜 9. 粗调节器 10. 细调节器 11. 镜臂 12. 推进器 13. 载物台 14. 倾斜关节 15. 镜柱 16. 镜座 17. 照明装置 18. 粗调限位环凸柄

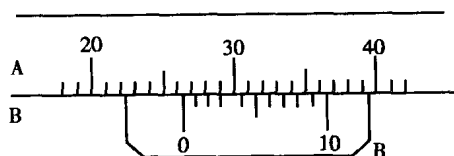


图 1-2 游标尺的用法

（二）光学系统

1. 反光镜：是装在镜台下面、镜柱前方的一面可转动的圆镜，它有平凹两面。平面镜聚光力弱，适合光线较强时使用。凹面镜聚光力强，适于光线较弱时使用。转动反光镜，可将光源反射到聚光镜上，再经镜台中央圆孔照明标本。

2. 聚光镜：在镜台下方，是一组透镜，用以聚集光线增强视野的亮度。镜台上方有一调节旋钮，转动它可升降聚光镜。往上升时增强反射光，下降时减弱反射光。

3. 可变光栏：是在聚光镜底部的一个圆环状结构。它装有多片半月形的薄金属片，叠合在中央成圆孔形。在圆环外缘有一突起的小柄，拨动它可使金属片分开或合拢，用以控制光线的强弱，使物像变得更清晰。

4. 目镜：装在镜筒上端，其上一般刻有放大倍数（如 $5\times$ ， $10\times$ ）。目镜内常装有一指示针，用以指示要观察的某一部分。

5. 物镜：装在物镜转换器上，一般分低倍镜、高倍镜和油镜三种。低倍镜镜体较短，放大倍数小；高倍镜镜体较长，放大倍数较大；油镜镜体最长，放大倍数最大（在镜体上刻有数字，低倍镜一般有 $4\times$ 、 $10\times$ ，高倍镜一般有 $40\times$ 、 $45\times$ ，油镜一般是 $90\times$ 、 $100\times$ ， \times 表示放大倍数）。

显微镜放大倍数的计算：目镜放大倍数 \times 物镜放大倍数=显微镜对实物的放大倍数。

二、显微镜的使用方法

（一）低倍镜的使用

1. 把显微镜放在桌面的左侧，镜臂对向胸前，坐下进行操作。用手转动粗调螺旋，使镜筒上升，然后转动物镜转换器，使低倍镜对准镜台中央圆孔（当转动到听见“咔”声响，或同时亦感到有阻力时立即停止转动，说明物镜已与镜筒成一直线）。

2. 对光：拨动聚光镜底部圆环的小柄，使光栏完全打开。旋转聚光镜升降螺旋，使聚光镜上升到和镜台相平。用左眼（两个眼睛都要睁开）在目镜上观察，同时用手调整反光镜，对好光源。要求视野达到完全均匀明亮。

3. 放置玻片标本：取蛙血玻片标本放在镜台上，有盖玻片的一面朝上。玻片两端用移动器夹住，然后转动螺旋，使玻片上要观察的标本对准镜中央圆孔。注意，镜台上的刻度可以标示玻片的坐标位置。

4. 调节物距：转动粗调螺旋，使低倍镜距玻片标本 0.5mm 左右。注意：必须从显微镜侧面观察物镜与玻片的距离。切勿用眼在目镜上观察的同时转动粗调螺旋，以防镜头碰撞玻片造成损坏。用左眼从目镜上观察，用手慢慢转动粗调螺旋下降镜台，当视野中出现物像时，再调节细调螺旋，直至视野中出现清晰的物像（许多椭圆形的红细胞）为止。如果物像不在视野中央，可稍微移动玻片位置（注意：移动玻片的方向与观察物像移动的方向恰好是相反的）。

反复练习上述各操作步骤，做到迅速熟练地找到标本，以及取光合适（即较熟练的应用反光镜、光栏和聚光镜）。

（二）高倍镜的使用

1. 一定要先在低倍镜下找到要观察的标本物像后，并把要放大的部分移至视野正中，同时调节到最清晰程度，才能进行高倍镜的观察。

2. 转动物镜转换器，使高倍镜转到镜台中央圆孔处。转换高倍镜时速度要慢，要细心，

并从侧面进行观察（防止高倍镜碰撞玻片）。如果高倍镜碰到玻片，说明低倍镜的物距没有调节好，应重新进行操作。

3. 调节物距：转换好高倍镜后，用左眼在目镜上观察。这时物像往往不清楚、或者要观察的部分不在视野当中，可用细调螺旋慢慢向上或向下转动（切勿用粗调螺旋）即能清楚看到物像。一般只需转动半圈或一圈就能达到要求。在高倍镜下，可见蛙血红细胞呈椭圆形，外被细胞膜，膜内为浅红色细胞质，中央有一圆形呈蓝紫色的细胞核。

（三）油镜的使用

1. 首先在高倍镜下找到所要观察的标本后，把所要观察的部分移至视野中央。

2. 转动物镜转换器，移开高倍镜，在标本上所要观察的位置加一滴镜油（香柏油）。

3. 转动物镜转换器，转换油镜，使之对准镜台中央圆孔处，浸在油滴中。

4. 转换好油镜后，用左眼在目镜上观察。物像如不清楚，可用细调螺旋慢慢向上或向下转动，即能清楚地看到物像。如仍看不清标本，需重新用低倍镜、高倍镜观察，然后再转换油镜。

5. 观察完标本后，用滴加上二甲苯的擦镜纸擦拭干净油镜镜头，再用另一张清洁的擦镜纸盖在玻片标本上，滴上1~2滴二甲苯，轻拉擦镜纸，将玻片上的镜油擦去。注意，勿擦坏标本。

三、使用显微镜注意事项

1. 持镜时要一手紧握镜臂，一手托住镜座，绝不能一把提起显微镜便走，以防目镜从镜筒滑出或反光镜脱落。

2. 轻拿轻放，不要把显微镜放在实验台边缘，防止碰翻落地。

3. 显微镜光学系统部件要用清洁的擦镜纸轻轻揩擦，切勿口吹、手抹或用粗布揩擦。

4. 使用时先用低倍镜调整光线。观察活体标本或染色较浅的标本时，要适当关小可变光栏使视野变暗，方能看得清楚。

5. 放置玻片标本时要对准镜台孔正中央，并且不能反放玻片，如标本玻片反放时高倍镜下看不到物像，并容易压坏玻片或物镜。

6. 观察时要双目睁开，切勿闭上一只眼睛。左眼观察视野，右眼用以绘图。低倍镜用粗调螺旋调节物距，高倍镜要用细调螺旋，粗、细调节螺旋都不能单方向过度地旋转。单向上升粗调螺旋会压碎镜片和损坏物镜。

7. 不要随便取出目镜，以防尘土落人物镜上。也不要任意拆卸任何零件，以防损坏。

8. 使用完毕后，转动粗调螺旋使镜台下降，取下玻片，转动物镜转换器，使物镜离开聚光孔。再上升镜台使物镜接近镜台（不要对着镜台孔）。然后以右手握镜臂，左手托镜座轻轻放入镜箱中。

9. 每次使用显微镜之前，先按显微镜登记卡片逐项检查显微镜各部分有无损坏。如发现损坏，应及时向教师报告。使用之后，认真填写显微镜使用登记卡片。

四、操作练习

（一）低倍镜、高倍镜的使用练习

1. 观察文字或字母装片：取一片字母装片，用低倍镜观察，反复练习对光、调光、标本放置和调节焦距等。如将玻片前后左右移动时，注意物像与玻片移动方向是否一致，玻片

上的字母是正像还是反像，为什么？

2. 观察羊毛片（或头发）交叉装片：取一张毛（发）交叉装片，先用低倍镜观察，找到两根毛（发）后，再将毛（发）交叉点移到视野中央，然后换高倍镜观察，再轻微转动细调节器，观察不同层次，判定哪条毛（发）在上方，哪条位于下方。

（二）油镜的使用练习

1. 取一张血涂片或取血一小滴，滴于清洁的载玻片一端，另取一张边缘平整的载玻片，按照图 1-5 所示做成血涂片。先用低倍镜再用高倍镜进行观察。

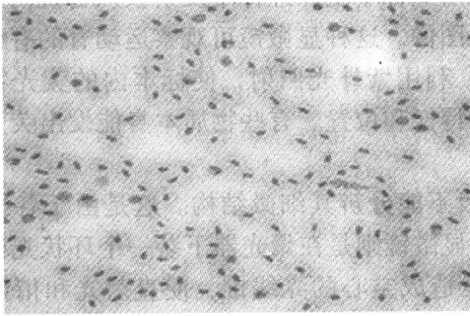


图 1-3 蛙血涂片

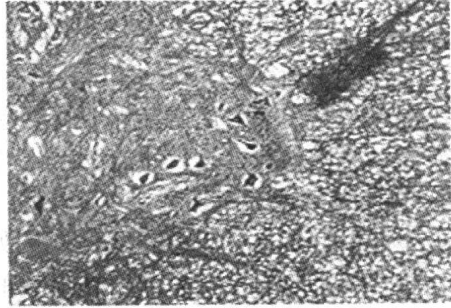


图 1-4 运动神经细胞

2. 用油镜观察，并分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞，比较三种物镜的放大倍数和分辨率。

3. 观察兔脊神经节切片（示固定染色的细胞）

取兔脊神经节切片标本先在调好光线的低倍镜下观察（固定染色的标本需调较亮光），低倍镜下找到要观察的标本，为淡紫色的神经节切面，在其外围包有被膜，且向内伸入，形成神经节的结缔组织支架，节内有许多大小不等的神经细胞，呈散在分布。然后转换高倍镜，选择完整而清晰的圆形神经细胞仔细观察其内部结构。可见到在细胞中央有一圆形核，核内有着色为深紫红色的圆形核仁及染色质颗粒，核与细胞膜之间是均匀浅紫色的细胞质，在细胞的外面围有若干个被囊细胞，它起保护神经细胞的作用。在神经细胞之间还可看到有轴索横断面和许多神经纤维，多呈交错排列。

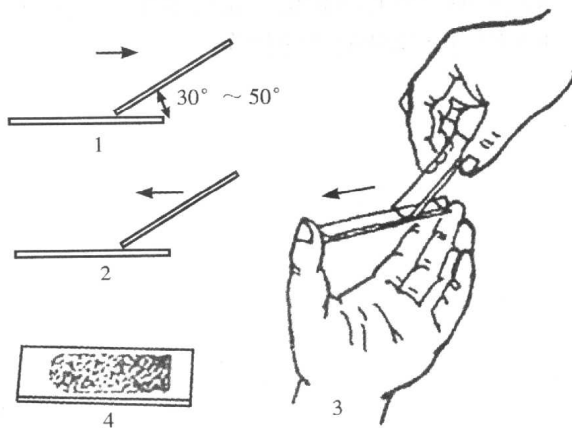


图 1-5 血涂片的制备方法

4. 观察完毕，务必将油镜按正确方法擦净。

五、其它几种显微镜简介

目前在生物学和医学研究中，常用的显微镜，还有以下几种：

1. 双筒解剖显微镜：解剖较小标本或观察玻片标本的全貌时，需使用解剖显微镜，以观察自然状态下较小的实体（正像）和较大的玻片标本，或解剖细小生物。

2. 暗视野显微镜：是一种具有暗视集中器或中央遮光板的显微镜。即在聚光镜上加一特殊装置，使光线从集光器透镜的边缘衍射或反射到标本上，经标本反射投入物镜内，使整个视野变暗，故能在视野中见到被检物体衍射之图像。这种显微镜可观察运动着的有机体。

3. 荧光显微镜：其特点是以紫外光为光源，利用紫外光照射，使标本内的荧光物质激发出不同颜色的荧光，以研究标本内某些物质的特征和位置。有些物质本身能发出荧光，有些物质需经荧光染料染色后才能发出荧光。

4. 相差显微镜：活细胞在普通光镜下，一般不能分辨其细微结构。这是由于各细微结构的折光性很近似或对比不够显著的缘故。相差显微镜则是在聚光器下装一个环状光栏，其物镜是安有相板的相差物镜。环状光栏的作用是造成空心的光线锥，使直射光和衍射光分离。相板的作用是使直射光和衍射光发生干涉，导致相位差变成振幅差（即明暗差），使反差加强。所以，可以观察活细胞中不同染色的微细结构。

5. 倒置显微镜：物镜位于标本的下方，而光源位于标本的上方。主要用于细胞培养时观察培养瓶中细胞的生长情况。

【实验报告与思考题】

绘图

1. 绘制兔脊神经节细胞（高倍视野）。
2. 绘制蛙血细胞（油镜视野）。

思考题

1. 怎样区分低倍镜、高倍镜和油镜，为什么用高倍镜或油镜时，必须从低倍镜开始？
2. 如果在高倍镜下未找到你所要看的物象，应从哪些方面找原因？
3. 经过哪些步骤才能在物镜下找到清楚的物像？

（郑立红）

实验二 动物细胞的显微测量

【实验目的】

掌握动物细胞显微测量的方法。

【实验原理】

细胞的大小，一般可以用显微测微尺来加以测量。显微测微尺是由目镜测微尺和镜台测微尺组成的，两尺必须配合使用。目镜测微尺是放入目镜内像平面上的标尺，是一特制的圆形小玻片，其上刻有 50 或 100 等分的刻度，每一刻度所代表的长度随放大倍数而改变。因此，使用前必须测定。镜台测微尺是在一块载玻片中央由圆形盖玻片封固的标尺，长度为 1mm 或 2mm，分为 100 格或 200 格，每格的长度为 0.01mm (10 μ m)。其目镜测微尺的长度标定方法和细胞显微测量方法如下。

【实验用品】

1. 材料：蟾蜍血涂片。
2. 器材：显微镜、目镜测微尺、物镜测微尺。

【实验内容及方法】

1. 将镜台测微尺置于载物台中央（注意刻度面朝上），用低倍镜调准焦距，进行观察，找到镜台测微尺的刻度。每大格为 0.1mm，每小格为 0.01mm。

2. 取下目镜的上透镜，将目镜测微尺有刻度的一面朝下，放在目镜内光栏下，再旋上目镜的上透镜。

3. 从目镜中观察目镜测微尺和镜台测微尺的刻度，转动目镜筒或移动镜台测微尺，使两标尺平行。转换高倍镜，在视野中使目镜测微尺的任一刻度线与镜台测微尺的任一刻度线重和为起点，沿着两标尺平行方向，找到另一重和刻度线为终点，记录下其间各自的格数，就可以算出目镜测微尺每小格的长度。公式如下： $L = 10 \times B/A$ (μ m)。

A = 目镜测微尺格数；B = 镜台测微尺格数；L = 目镜测微尺每小格所代表的长度。

4. 取下镜台测微尺，换上需测量玻片标本，记录目镜测微尺所测量的标本的刻度，乘以 L，即为标本的尺度。

5. 蟾蜍红细胞的测量：注意将被测的细胞移放在视野的中央。为避免细胞之间的误差，需分别记录五个细胞的数据，取其平均值。

6. 更换物镜或目镜时，需重新标定刻度。

7. 根据测量结果，可计算出各种细胞和细胞核的体积及核质指数。

椭圆形细胞体积： $V = 4\pi ab^2/3$ （a 为长半径；b 为短半径）

圆球形细胞体积： $V = 4\pi r^3/3$ （r 为半径）

核质指数： $NP = V_n / (V_c - V_n)$ （ V_c 为核的体积； V_n 为细胞的体积）

【实验结果与分析】

计算您经过测量所得到的蛙红细胞的体积及核质指数。

（潘洪明）

实验三 细胞内糖原、蛋白质及核酸的显示

【实验目的】

1. 熟悉糖原、蛋白质、核酸在细胞内的主要存在部位。
2. 了解细胞内糖原、蛋白质、核酸显示的原理和方法。
3. 进一步掌握显微镜的使用方法。

【实验用品】

1. 材料：土豆、洋葱、肝糖原切片、蟾蜍。
2. 器材：显微镜、载（盖）玻片、刀片、小镊子、解剖剪刀、染色缸、染色架。
3. 试剂：革兰碘液、5%三氯醋酸、固绿染液、甲基绿·派洛宁染液、Carnoy 固定液、酒精、丙酮。

【实验内容与方法】

一、糖原淀粉的显示

（一）原理

糖原和淀粉是生物有机体生命活动能量的主要来源。淀粉是一种植物多糖，贮藏于植物的种子、块茎、块根中。淀粉遇碘呈蓝色，这是由于碘被吸附在淀粉上，形成一复合物—碘化淀粉。碘化淀粉是不稳定的，极易被醇、氢氧化钠和热分解，因而使颜色褪去。其它多糖大多能与碘呈特异的颜色反应，这些呈色物质不稳定。糖原又称动物淀粉，是动物细胞内贮藏能量的多糖类物质。在肝脏中尤为丰富。可用过碘酸雪夫试剂反应（periodic acid Schiff reaction），简称 PAS 反应检测。含乙二醇基的多糖在高碘酸的作用下氧化而产生双醛基，醛基进而与 Schiff 液反应，使其中的无色品红变成紫红染料而附于含糖的组织上，着色的部分即为肝糖原。

（二）试剂配制

革兰碘液：称碘化钾 1g，溶于 50ml 蒸馏水中，再加 0.5g 碘使之溶解。最后用蒸馏水稀释至 150ml，盛于棕色瓶内，保存暗冷处。

（三）方法

1. 淀粉

（1）马铃薯徒手切片。

（2）取一薄片放在载玻片上，用吸管吸取革兰碘液一滴于马铃薯薄片上，盖上盖玻片。

(3) 置光学显微镜低倍镜下观察。可见在多角形的薄壁细胞中，有许多椭圆形蓝色的颗粒，即为淀粉粒。

2. 糖原：在光镜下观察肝糖原切片（Schiff 反应肝组织切片），可见肝细胞略呈多角形，中央有 1~2 个染成蓝色圆形的细胞核。在细胞质中可见许多紫红色的小颗粒，即为肝糖原，如图 3-1。

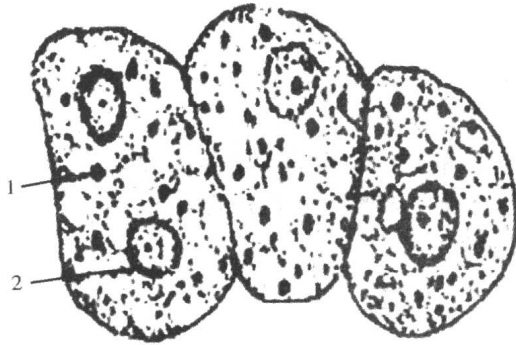


图 3-1 肝细胞的糖原
1. 糖原颗粒 2. 细胞核

二、细胞内酸性蛋白质和碱性蛋白质的显示

(一) 原理

蛋白质的基本组成单位是氨基酸，是两性电解质。随着溶液 pH 值的不同，蛋白质可离解为正离子、负离子或两性离子，如果在某一 pH 值时，蛋白质颗粒上所带的正、负电荷总数相等，在电场中既不向正极移动也不向负极移动，这时溶液的 pH 值即为该蛋白质的等电点。由于蛋白质的游离基团除了末端氨基和末端羧基外，还有许多侧链，其上许多集团在溶液也可以电离，因此，一个蛋白质分子表面四周都有电荷。不同蛋白质分子所带有的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不等，它们的等电点也不一样。因此蛋白质分子所带的静电荷既受所在溶液的 pH 值的影响，也取决于蛋白质分子组成中碱性氨基酸和酸性氨基酸的含量。在生理条件下，整个蛋白质带负电荷多，为酸性蛋白质（等电点偏向酸性）；带正电荷多，为碱性蛋白质（等电点偏向碱性）。所以，用不同 pH 值的固绿染液（一种弱酸性染料，本身带负电荷）对细胞中的蛋白质染色，可使细胞内的酸性蛋白和碱性蛋白分别显示。

(二) 试剂配制

1. 5% 三氯醋酸液：称取 2.5g 三氯醋酸溶于 50ml 蒸馏水中。

2. 染色液：

(1) 三种母液（实验前配制）

A：0.2% 固绿染液：取 0.2% 固绿溶于 100ml 蒸馏水中。

B：1/75mol/L HCl（稀释一倍后 pH 值为 2.0~2.5）：取 12mol/L 的浓盐酸 0.11ml 加入到 98.89ml 蒸馏水中混匀。

C：0.05% 碳酸钠溶液（稀释一倍后 pH 值为 8.0~8.5）：称取 50mg 碳酸钠（ Na_2CO_3 ）溶于 100ml 蒸馏水中，混匀。

(2) 两种蛋白质染液 (实验时混合)

甲液: 0.1% 酸性蛋白固绿染液: 母液 A + B (1:1), 即为 0.1% 酸性固绿染液。
(1/150mol/L HCl pH 值为 2.0 ~ 2.5)。

乙液: 0.1% 碱性蛋白固绿染液: 母液 A + C (1:1), 即为 0.1% 碱性固绿染液
(0.025% Na_2CO_3 pH 值为 8.0 ~ 8.5)。

(三) 方法

1. 取材与涂片: 将蟾蜍用乙醚麻醉后, 剪开胸腔, 打开心包, 小心地在心脏上剪一小口, 取心脏血一小滴, 滴在干净载玻片右端, 另取一边缘光滑平齐的玻片作为推片, 制作厚薄适中的血涂片。制成的涂片室温晾干。每个同学制血涂片两张, 并做好标记。

注意: ①取血滴不宜太大, 以免涂片过厚, 影响观察。②要使涂片厚薄适中。注意拿片姿势, 推片角度和速度要适中, 要用力均匀。③涂片一般在后半部观察效果较好。

2. 固定: 将晾干的涂片浸于 70% 乙醇中固定 5 分钟, 取出后, 室温下晾干。

3. 三氯醋酸处理: 将已固定的血涂片浸于 5% 三氯醋酸中 60℃ 温度处理 30 分钟。取出后用清水冲洗 3 分钟以上 (注意一定要反复洗净, 不可在涂片上留下三氯醋酸痕迹, 否则酸性蛋白和碱性蛋白的染色不能分明)。然后用滤纸吸干玻片上的水分。

4. 染色和镜检: 将显示酸性蛋白的涂片放入 0.1% 的酸性固绿溶液中染 5 ~ 10 分钟, 清水冲净, 晾干。将显示碱性蛋白的涂片在 0.1% 的碱性固绿溶液中染 0.5 ~ 1 小时 (视染色深浅而定), 清水冲净, 晾干。分别镜检。

5. 观察结果: 用 0.1% 的酸性固绿染液染色处理过的蟾蜍红细胞, 胞质和核仁中蛋白质均被染成绿色, 此即酸性蛋白在细胞内的分布; 而胞核内染色质部分并不染上色 (但时间太长可能染上色)。经 0.1% 的碱性固绿染液染色处理的标本中, 只有细胞核内染色质部分被染成绿色, 此即碱性蛋白在细胞内的分布, 而胞质及核仁不着色。

三、细胞内 DNA 和 RNA 的显示

(一) 原理

早年曾用甲基绿·派洛宁 (Methylgreen - Pyronin) 作为一般的组织学染色。后来用核酸水解酶 (RNase 和 DNase) 作为“酶水解对照”研究, 证实甲基绿所染者为 DNA, 可被脱氧核糖核酸酶 (DNase) 消化而特异性失染。派洛宁所着色者为 RNA, 可经核糖核酸酶消化使原派洛宁阳性物质失染。从而使甲基绿·派洛宁染色成为一种显示核糖核酸的组织化学方法。甲基绿染 DNA 和派洛宁染 RNA 不是化学作用, 而是与 DNA 和 RNA 聚合程度不同, 对碱性染料有不同的亲和力而进行选择染色。甲基绿分子上有两个相对的正电荷, 它对聚合程度高的 DNA 有强的亲和力, 故可使分布在胞核中的 DNA 被染成蓝色或绿色; 而派洛宁分子上只有一个相对的正电荷, 它仅和聚合程度较低的 RNA 相结合, 使分布于胞质和核仁中的 RNA 染成红色。因此, 可用 Brachet 反应对细胞中的 DNA 分子和 RNA 分子进行定位、定性和定量分析。

(二) 试剂的配制

1. 2% 甲基绿染液: 称取 2g 去杂质甲基绿粉溶于 0.2mol/L 的醋酸缓冲液 100ml 中。甲基绿粉中往往混有杂质甲基紫, 此杂质可影响染色效果, 必须预先除去。除去甲基紫杂质的方法是: 将甲基绿粉溶于蒸馏水中, 往分液漏斗中加入足量的氯仿 (三氯甲烷), 用力振荡, 然后静置, 弃去含甲基紫的氯仿, 再加入氯仿重复数次, 直至氯仿中无甲基紫为止, 最后放

入 40 ~ 45℃ 温箱中干燥后备用。

2. 5% 派洛宁染液：称取 5g 派洛宁（吡罗红）溶于 100ml 0.2mol/L 的醋酸缓冲液中混匀。

3. 甲基绿·派洛宁染液：

A 液：5% 派洛宁染液 17.5ml，2% 甲基绿染液 10ml，蒸馏水 250ml。

B 液：0.2mol/L 醋酸缓冲液（pH 4.8）：0.2mol/L 醋酸 4 份（1.2ml 醋酸加蒸馏水至 100ml），0.2mol/L 醋酸钠溶液 6 份（2.7g 醋酸钠 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水至 100ml）。

使用液：将 A、B 二液等量混合即成。该液应现配现用，不宜久置。

4. Carnoy 固定液：无水乙醇 6 份，氯仿 3 份，冰醋酸 1 份。使用前现配。

（三）方法

1. 洋葱表皮细胞 DNA、RNA 的显示

（1）切开洋葱鳞茎，用镊子轻轻撕下洋葱鳞片的内侧面膜状的半透明内表皮，用剪刀剪下一小块（约 4mm^2 大小）置于玻片上。

（2）用吸管吸取甲基绿·派洛宁染液，滴一滴于洋葱表皮上，染色 30 ~ 40 分钟。

（3）用吸管吸取一滴蒸馏水冲洗表皮，并立即用吸水纸吸干，因为派洛宁易脱色。

（4）盖上盖玻片，置显微镜下进行镜检。可见细胞质和核仁呈淡红色或红色，表明含 RNA；而核质呈蓝色，表明含有 DNA。

2. 蟾蜍血涂片 DNA、RNA 的显示

（1）制备蟾蜍血涂片。

（2）固定：将晾干的涂片于 Carnoy 液中固定 10 ~ 30 分钟。

（3）80% 酒精浸洗 2 ~ 3 分钟。

（4）蒸馏水洗数次（每次 1 ~ 2 分钟），晾干。

（5）染色：将血涂片平放在染色架上，用吸管吸取甲基绿·派洛宁染色液，滴数滴于血标本上，染色 10 ~ 20 分钟。

（6）冲洗：用蒸馏水冲洗。除去片上的浮色，并用滤纸吸干多余的水分。

（7）分化：将血涂片浸入纯丙酮中分化片刻（时间要少于 1 秒钟，以免分化过度），取出晾干。

（8）中性树胶封固或直接镜检。光镜下可见细胞核呈绿色，细胞质呈淡红色。

【实验报告及思考题】

1. 绘图说明洋葱鳞茎表皮细胞内 DNA 和 RNA 的分布或蟾蜍血细胞内酸性蛋白及碱性蛋白的分布。

2. 扼要说明细胞内糖原、蛋白质及核酸显示的原理。

（王 玉）