



生命科学实验指南系列

Short Protocols
in Cell Biology

精编细胞生物学 实验指南

〔美〕 J.S.博尼费斯农 M.达索 J.B.哈特佛德

J.科平科特-施瓦兹 K.M.山田

章静波 等

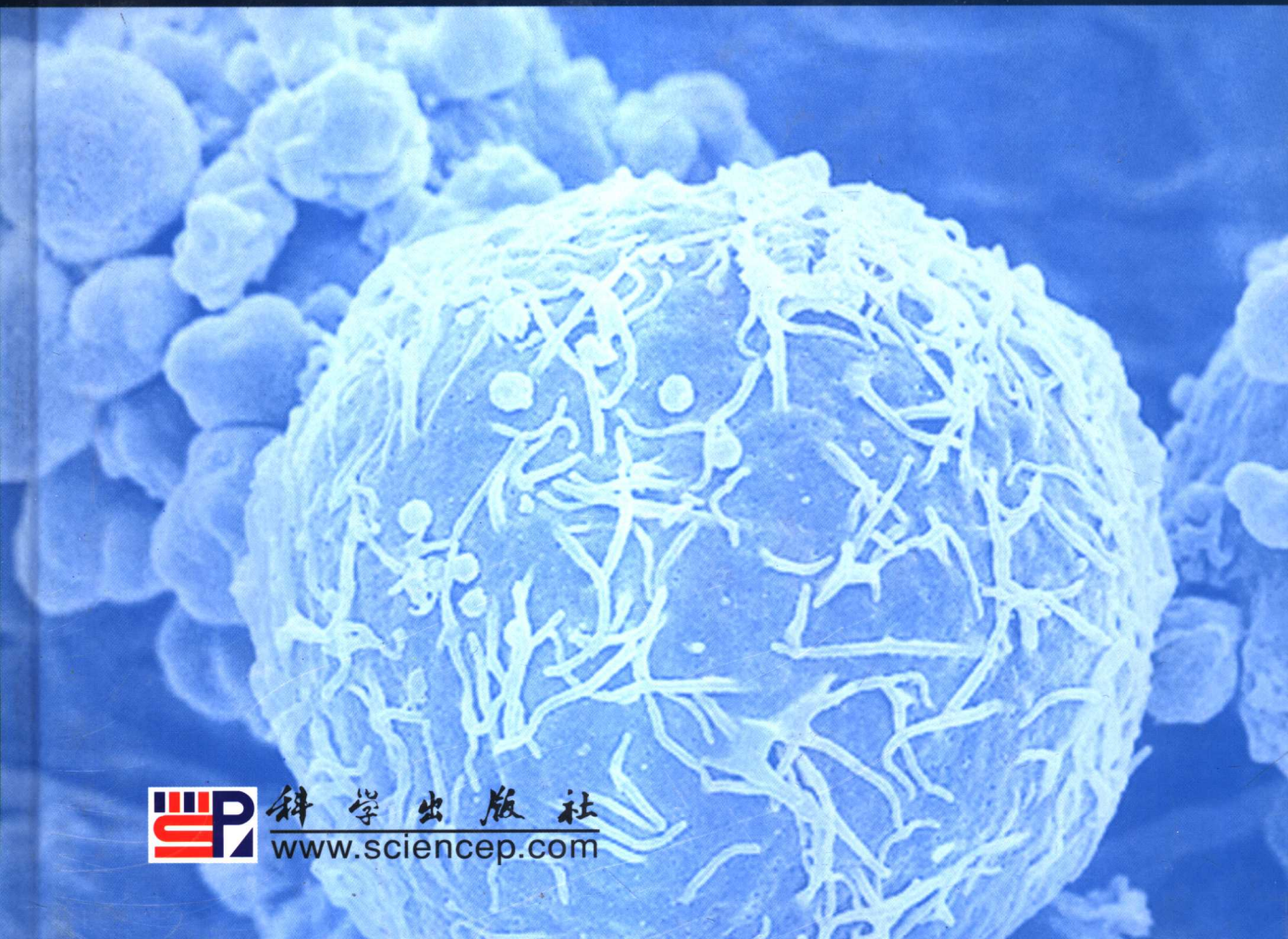
主编

翻译



科学出版社

www.sciencep.com



生命科学实验指南系列

精编细胞生物学实验指南

Short Protocols in Cell Biology

〔美〕J. S. 博尼费斯农 等 著

章静波 方 瑾 王海杰 谭玉珍 主译
陈实平 陈誉华 张钦宪 陈克銓 主校

科学出版社

北 京

图字:01-2005-3954号

内 容 简 介

本书内容翔实全面,主要包括:细胞培养、细胞的制备与分离、亚细胞组分分离和细胞器分离、抗体、显微镜技术、细胞蛋白质的特性、电泳与免疫印迹、蛋白标记和免疫沉淀、蛋白质的磷酸化作用、蛋白质转运,以及细胞增殖、衰老和死亡、体外重建、细胞黏附和细胞外基质、细胞的能动性、细胞器运动。全书还附有各种实用信息和数据,包括试剂与溶液的配制、细胞生物学研究中常用的药物概要和各种常用技术的介绍等。

原书名:Short Protocols in Cell Biology.

Copyright©2003 by John Wiley & Sons, Inc.

All rights reserved. Authorized translation from the English language edition by John Wiley & Sons, Inc.

图书在版编目(CIP)数据

精编细胞生物学实验指南/(美)J. S. 博尼费斯农等著;章静波等译. —北京:科学出版社,2007

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-017579-3

I. 精… II. ①博…②章… III. 细胞生物学-实验-指南 IV. Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第073984号

责任编辑:李悦 彭克里 刘晶/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/封面设计:王浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2007年1月第一次印刷 印张:54 1/4

印数:1—3 000

字数:1 242 000

定价:120.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

译校者名单

译者 章静波 (中国协和医科大学基础医学院)
董敏 (中国医学科学院基础医学研究所)
王艳辉 (中国医学科学院基础医学研究所)
熊伟鹏 (中国医学科学院基础医学研究所)
陈实平 (中国医学科学院基础医学研究所)
冯若 (郑州大学医学院)
刘书漫 (郑州大学医学院)
崔景彬 (郑州大学医学院)
陈鲤翔 (郑州大学医学院)
朱自强 (中国医学科学院基础医学研究所)
刘伟 (中国医学科学院基础医学研究所)
王艾琳 (北华大学医学院)
安倍莹 (北华大学医学院)
曲莉 (北华大学医学院)
宋艳 (北华大学医学院)
赵永娟 (中国医学科学院基础医学研究所)
方瑾 (中国医科大学基础医学院)
张惠丹 (中国医科大学基础医学院)
赵伟东 (中国医科大学基础医学院)
陈澄 (中国医科大学基础医学院)
王海杰 (复旦大学上海医学院)
谭玉珍 (复旦大学上海医学院)
王莎丽 (中国医学科学院基础医学研究所)

审校者 陈克铨 (中国协和医科大学基础医学院)
陈实平 (中国医学科学院基础医学研究所)
章静波 (中国协和医科大学基础医学院)
张钦宪 (郑州大学医学院)
刘伟 (中国医学科学院基础医学研究所)
朱自强 (中国医学科学院基础医学研究所)
方瑾 (中国医科大学基础医学院)
陈誉华 (中国医科大学基础医学院)

译者序

细胞生物学的重要性及其在生命科学中的重要地位已被科学家们所公认。2002年第6916期 *Nature* (《自然》) 杂志的封面上赫然写着“Cell Biology is a Big Science”(细胞生物学是一门大学科)。为什么细胞生物学是个大学科呢? 因为它是包括医学在内的一切生命学科的基础, 它所研究的对象——细胞是生命的基础, 无论单细胞生物还是多细胞生物, 细胞的活动往往代表着或是牵动着整个机体的状况。因此早在1925年, 细胞生物学的先行者 E. B. Wilson 便在他不朽的著作《细胞的发育与遗传》(*The Cell in Development and Heredity*) 中指出“每一个生物学问题的关键最终必然从细胞中去寻求”(The key to every biological problem must finally be sought in the cell)。

自1665年 Robert Hooke 第一次发现细胞以来, 人们对细胞的研究从未间断过, 而且研究细胞的兴趣与日俱增。但是直到20世纪50年代, 细胞生物学的研究还基本停留在细胞的形态、结构、组成的层面上。虽然在此期间细胞生理学、细胞遗传学、细胞化学等分支学科均已发展和建立起来, 但只有在分子生物学兴起之后, 才真正将细胞生物学抛向了一个更高的层面, 诞生了细胞生物学。

如今, 细胞生物学的研究范围更加广泛, 研究层次更加深入, 几乎涉及机体的一切生命现象, 如生长、发育、变异(尤其是癌变)、疾病与死亡(尤其是细胞凋亡)等。同时, 它又深入到分子、亚细胞的层面, 将细胞与整体的研究相结合。为此, 不少相关学科的研究者参与到细胞生物学的研究中来, 无怪乎近年来不少诺贝尔奖授予了与细胞生物学研究相关的学科。例如, 1999年授予细胞内信号系统的研究, 2001年授予细胞周期的研究, 2002年授予细胞凋亡的研究, 2003年授予与细胞通道有关的研究, 2006年授予RNA干扰的研究等。

学科间的融合及相关科学家参与细胞生物学的研究不仅促进了细胞生物学的迅速发展, 而且使得细胞生物学研究方法与技术也发生了革命性的变化。我们不但可以观察固定染色的细胞, 还可以观察生活着的细胞; 不但可以研究细胞内已存在的物质成分, 还可以分析细胞内物质动态改变的代谢过程; 不仅可以研究作为一个单独实体的细胞运动, 还可以观察细胞器的运动; 不但可以研究细胞间的相互作用, 还可以研究细胞与周围环境的相互作用。所有这一切不仅使得细胞生物学成为一门大学科, 而且几乎成为研究所有其他生命科学不可或缺的工具。美国 Wiley 出版社曾编著《最新细胞学实验方法汇编》(*Current Protocols in Cell Biology, CPCB*)。这部方法学工具书无疑具有大而全的特点, 然而就实用性来说未免过于庞大, 于是有了精编本。精编本实用而不烦琐, 适合于所有从事细胞生物学以及将细胞生物学技术方法作为工具的其他生命学科的科研与教学人员, 尤其是初涉细胞生物学研究的莘莘学子。

迄今, 我国也已编著了不少关于细胞生物学实验技术方法指南的工具书, 它们对于推动我国细胞生物学科研究与教学发挥了重要作用, 但就系统性来说与此书相比还有不小的差距, 另外本书所描述的方案的步骤颇为详尽, 操作之严密性也堪称典范。翻译此书

的意义不仅在于可以引进其中的方法技术，或许这种编写与著作模式也是适合“拿来主义”的。希望不久的将来我国也能编出适合我们自己国情的更好的细胞生物学方法学书籍来。

本书译者多为从事细胞生物学或相关学科的科研教学人员，他们对本书内容比较熟悉，相信译文能忠实反映出原文的本意。然而，鉴于本书内容新，有些技术方法尚未在国内运用，因此可能有理解原文不精确之处，甚至误译，谨希望读者在使用时及时指出并予以指导。我们将以适当方法及时予以纠正，免得谬种流传，误人子弟。这也是本书译者的共同心愿。

他山之石，可以攻玉。相信译本的出版能为推动我国细胞生物学及相关学科的发展起到应有的作用。

章静波

中国协和医科大学基础医学院

前 言

细胞生物学的研究体系日益扩大。要想领略这种扩展，途径之一便是去参加本领域的重要会议，诸如美国细胞生物学学会（American Society for Cell Biology）的年会。你可以悠闲地漫步于大厅的展板区，甚至于都不必驻足于某一版面，就可以深刻感受到细胞生物学范畴之辽阔。对于那些在过去一二十年间经常光顾这种展厅的人们来说，细胞生物学的这种动态态势以及这种爆发性的发展是毫不奇怪的——在愈来愈多的研究体系中只能是愈来愈多。以往展板区域主要由细胞的画面主宰，这些细胞都经由电子显微镜学家的固定（很呆板地），并且只是以黑白两色显示出来。虽然电子显微镜目前对于我们了解细胞构筑仍然有贡献，但新近展板区已出现一排排活细胞的电脑增强视频影像（computer-enhanced video images），这些细胞均经过不完全活性染色才显示，诸如罗丹明红（rhodamine red）、荧光素绿（fluorescein green）以及被称作绿色荧光蛋白的特异绿色等。冰冻蚀刻的加入则以冷冻定帧法（freeze frame）来展现细胞。此外在视频影像间还散在有另一些展板，它们详细记录了众多细胞成分的分子特征。还有一些展板报道了用基因削减或基因敲除显示的有关它们功能的新近发现。正如罗盘的星点有其应有的位置一样，酵母、果蝇和蠕虫的遗传学研究兴旺于一方，而在细胞生物学基础研究和临床医学之间架设桥梁的研究也在另一方不断地涌现。

很显然，今天称自己为细胞生物学家的科学家乃是一个多学科群体，这种多学科性质隐藏着巨大的学术价值。那些曾经将研究学科分隔开来的边界如今已逐渐消失，细胞生物学家也已赞同没有哪一种单独的途径可以揭开细胞的奥秘。新技术和新技术学随着试验成真并肩而至，并且用作细胞生物学在本领域开拓的工具。正是细胞生物学的这一面目的变化以及其代表巨大挑战的方法学共同促成了《精编细胞生物学实验指南》的问世。本书要阐述的一个基本问题是，在细胞生物学领域里应在何处划出其边界。我们的决定是拒绝划出这种边界，因为它们完全是人为的，并且，糟糕的是，会产生反效果。相反，我们企图努力弥合该领域的多样性。本指南要包括那些对细胞生物学家仍有价值的“经典的”方法，也要提供旨在成为今后之经典的程序。

我们没有理由怀疑细胞生物学的研究领域随时都会很快地停滞。事实上，一名细胞生物学家之所以激励不已，部分地出于革新和新发现所带来的不间断的惊奇。为此，我们这一专业需要一些可靠的、便于使用的，而且还要反映出该领域扩展的实验方法学的资料。为了符合这一要求，我们收集了覆盖细胞生物学众多方面的一系列实验方案，虽然这一套方案还不完全，但可以认为它是一个“初学者工具箱”，包括有许许多多我们这一专业中最常用和必需的工具。

《精编细胞生物学实验指南》所提供的是发表于《最新细胞生物学实验方法汇编》（*Current Protocols in Cell Biology*, CPCB）中那些方法的精编本。我们的这一精编本是从原著“核心”手册以及季度新资料汇编抽取其精粹所构成的，包括CPCB新涵盖的主要方法，并一步一步地予以描述。为了适用于实验室，精编本的设计为流线型版式，

这与 CPCB 不同。这本精编本的内容也足够详细，研究人员可将其看作是独立的实验室指南。若想得到更多的信息和相关的讨论，我们推荐读者去参阅 CPCB 中的评述和详细的注释。

虽然掌握书中的技术可以使得读者从事细胞生物学及相关领域的研究，但无论是指南或是 CPCB，并不意图取代细胞生物学研究生水平的课程或是作为本领域中的完整教科书。此外我们极力主张读者们要向你身边那些富有经验的研究人员学习，以取得第一手经验。

如何使用本指南

结构

本指南中的主题是按章编排的，其中的方案插入每章各单元中。所谓“单元”，一般是描述一种方法，它们通常包括有一个或更多的方案，其中有材料、步骤和对每一技术的注释。在指南中，有关材料的描述顺序和结构与《最新细胞生物学实验方法汇编》不完全相同。各章均重新安排、重编序号，在某些情况里还有相互交融。各章中的单元也重新作了安排，但每章和每单元的题目基本上还是与 CPCB 相一致的。对于那些翻阅这两部实验指导的读者，当他们需要更多的解释和评述时，将会发现很容易在这两本书中找出相应的单元。

整个指南中所提到的许多试剂和步骤都是反复应用的，因此在各单元间我们广泛使用了相互参照，而不重复描述步骤。相互参照可确保那些冗长的和复杂的方案变得不那么烦琐，它只是描述准备新材料和分析结果的那些辅助步骤。某些描述常用技术和配制的单元（如凝胶电泳、离子交换层析、免疫印迹、放射自显术），则可与描述它们应用的其他单元相互参照。因此分离或鉴别蛋白条带时，便可相互参照第 7 章中（描述凝胶电泳的各个步骤）某个单元（也就是单元 7.1）。对于某些广泛使用的技术（如透析），读者又可参考附录 3。对于那些分子生物学和蛋白质生物学常用的方法，读者可参考《最新分子生物学实验方法汇编》（*Current Protocols in Molecular Biology*）和《最新蛋白质科学实验方法汇编》（*Current Protocols in Protein Science*）或它们的精编本。

本指南有四则附录，每一种方法中所用的试剂和溶液的配制及特别标注者可见附录 1，其余附录包括有用的量度和资料（附录 2）、常用的实验技术（附录 3）以及供应商的名号和地址（附录 4）。

方案

指南中的许多单元包括多种方案，每一种方案描述一系列步骤。基本方案出现于每一单元之前，通常是总体推荐的或是最普遍应用的方法。备择方案乃针对采用不同设备和试剂而达到相同结果时所选用者，其原材料来自不同的途径，或者终产物不同于基本方案。支持方案所描述的是进行基本方案或备择方案所需要的那些附加步骤，这些步骤独立于核心方案，因为它们或许可以在指南的另外地方用上，或是在与基本方案步骤不相关的一定时限中进行。

试剂和溶液

方案所要求的试剂均在步骤开始之前以材料目录一一列出。许多属于普通的储存液，另一些是常用的缓冲液和培养基，还有的则为特殊方案所专用的溶液。有标记符号(√)的材料系列的配方见于附录 1。要特别注意的是，某些溶液虽然配方不同，但在不少单元里有相似的名称(如溶解缓冲液)，因此需要针对配方准备试剂。为避免混乱，除了常用的缓冲液和溶液，如 TH 缓冲液和 PBS 之外，单元(要用到配方者)的附属编目可在附录 1 中每一种试剂名下找到。

注意：除非另有说明，在本指南中所有方案中均应使用去离子蒸馏水(或相当质量的水)，并以此制备各种试剂和溶液。

设备

现代细胞生物学实验室中的各种标准设备列于附框中。这些设备在指南中被广泛应用。每一方案之前的材料目录只包括“特殊的”器材，也就是实验室中不一定备有的常规物件，或者是需要特别准备的物品。

标准的实验室设备

下列是现代细胞生物学实验室某些标准的设备——也就是在本指南中所广泛采用的。因此它们通常并不包括在每个具体的材料目录之中。我们并不意图列出每一个方案中每个步骤所需的所有材料，只是将那些在实验室不常准备的或是需要特别准备的设备列出。附录 4 提供了有关实验室设备供应商家的联系信息。

敷料品：棉头的和毛料的

高压锅

封袋机

天平：分析天平和制备天平

烧杯

桌布：塑料垫(包括蓝色小衬垫)

本生灯

离心机：低速(20 000r/min)冷冻、超速(20 000~80 000r/min)、低速大容量、台式，均装配有合适的转头和接头

离心管和瓶：各种大小的塑料、玻璃离心管和瓶夹子

圆锥形离心管：塑料和玻璃的

各种容器：用于洗凝胶和洗膜的各种塑料和玻璃的容器

玻片染色缸：玻璃的适用于 25~75mm 的载玻片

冷冻管：无菌的(如 Nunc)

比色皿

有害生物废料箱和废料袋

生物安全柜：组织培养或层流超净台；过滤空气和维持气流形式，可保护因操作者而感染细胞或者因细胞而感染操作者

瓶子：玻璃和塑料的，带喷射器的

盖革计数器

干胶机

手套：一次性手套和热抗性手套

刻度量筒

加热器：恒温控制的，用于试管和微量离心机

血细胞计数器和/或电子细胞计数仪

匀浆器

加湿 CO₂ 培养箱

冰桶

制冰机

显微镜浸油

实验室外衣
干燥器和干燥剂
干冰
电泳设备：琼脂糖和丙烯酰胺，最大的和小型的电源
胶片显影系统和暗室
过滤装置
镊子
分部收集器
冰箱：-20°C，-70°C，液氮
通风橱
显微镜玻璃载片：25~27mm，以及盖玻片
带相机的显微镜：立式、倒置、荧光、相差、解剖
微量滴定板阅读器
研钵和研杵
烤箱：干燥用烤箱和微波炉
裁纸刀：大号
纸巾
石蜡膜
巴氏吸管和球囊
实验室玻璃用品
底片灯箱
液氮
冷冻干燥机
磁力搅拌器：带和不带有加热装置，附有搅拌棒
记号笔：包括防水记号笔、中国毛笔和荧光笔
微量离心机：Eppendorf 型，最大速率在12 000~14 000r/min
离心管：0.2ml，0.5ml，1.5ml，2.0ml
橡皮细胞擦或塑料细胞刮
橡皮塞子
安全眼罩
解剖刀和刀片
液体闪烁仪， β
剪刀
摇床：定轨和平台，室温或37°C
分光光度计：可见光和UV
真空旋转蒸发器
注射器和针头
胶带纸：不透光胶纸、电工黑胶带、高压锅胶带和Time胶带
试管：玻璃和塑料，不同大小规格，带有或不带有试管帽
PCR热循环仪和试管
pH计
pH试纸
吸管：带刻度
移液管：可调试，0.5~10 μ l、10~200 μ l和200~1000 μ l
Polaroid照相机或影视记录系统
电源：300V用于聚丙烯酰胺凝胶，2000~3000V适用于其他用途
架子：用于试管和微量离心管
射线保护屏：Lucite或Plexiglas
放射性液体或固体废料收集箱
冰箱：4°C
圈式铁架及配套铁圈
定时器
工具箱及常用工具
盘：塑料和玻璃的，不同大小规格
管子：橡皮和聚乙烯的
UV灯：长波和短波
UV透光仪
UV透光塑料包装膜（如Saran保鲜膜）
真空干燥器
真空烤箱
涡旋混合器
组织捣碎机
可调温水浴箱
纯水系统
X光片暗盒和增感屏

供应商

化学试剂、生物制品和设备的供应商名录在整个指南中均有列出。在某些情况下，名牌产品具有高质量或者它只有在商业中心有售。但也有这种情况，即限于本指南的作者经验，对有些品牌不甚了解。在后一种情况里，对于一个初级的细胞生物学实验者来说，在他们获得商业工具时，我们的推荐只能作为参考；对于有经验的研究人员则鼓励他们使用别的品牌以代替自己常用的品牌。在本指南中所提到的所有供应商的地址、电话号码、传真号码和 Web 网址均记载于附录 4。

参考文献

本精编指南只给出最基本的有限数目的参考文献，以此作为每个单元的背景。这些参考文献以缩写的形式列于每单元之后，而全部文献则列于本书之末的参考文献。所引证的特别参考文献目录，如图与表中者，也可在参考文献栏内找到。那些对方法的背景和应用想有更完全了解的读者可参阅《最新细胞生物学实验方法汇编》。

安全考虑

任何使用这些方案的研究人员均可能遇到下列有害的或潜在有害的物质：①放射性物质；②有毒化学物质和致癌的或致畸的物质；③致病的和感染性的生物制剂；④某些重组 DNA 结构。在某些单元里包括有关安全防范的陈述中，我们都强调本书使用者必须要小心谨慎，遵循良好的操作规范，要严格根据当地和国家有关规定处理所有的实验材料。

致谢

Wiley 出版社精编指南编辑部的同仁们支持和帮助我们将该课题荟萃在一起。他们是 Tom Downey, Elizabeth Harkins, Tuan Hoang, Scott Holmes, Nadine Kavanaugh, Susan Lieberman, Allen Rans, Liana Scaletter, Mary Keith Trawick 和 Kathy Morgan。我们特别感激我们的许多同事——包括我们自己实验室的同事以及全球所有有关机构和企业实验室的同事，是他们为本指南提供了材料，并和我们分享了他们的实验程序和经验。

推荐的基本读物

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2003. *Essential Cell Biology*, 2nd ed. Garland Publishing, New York.

这是由《细胞的分子生物学》(*Molecular Biology of the Cell*) 的作者所撰写的一本细胞生物学导论。

2. Alberts B. , Johnson A. , Lewis J. , Raff M. , Roberts K. and Watson, J. D. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Publishing, New York.

3. Lodish H. , Berk A. , Zipursky L. , Baltimore D. and Darnell, J. 2000 *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York.

这是两本完整和描述透彻的教科书，它们将生物化学、遗传学、结构生物学、传统细胞生物学有效地融会贯通起来，组成为一部现代分子和细胞生物学。

Juan S. Bonifacino, Mary Dasso,
Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-
Schwartz, and Kenneth M. Yamada

目 录

译者序

前言

第 1 章 细胞培养	1
单元 1.1 哺乳动物细胞培养的基本方法	2
基本方案 单层细胞的胰酶消化和传代	2
备择方案 悬浮培养的细胞传代	3
支持方案 1 人单层贴壁细胞的冻存	3
支持方案 2 悬浮细胞的冻存	4
支持方案 3 人细胞系的解冻与复苏	4
支持方案 4 用血细胞计数板和台盼蓝染色法测定细胞数目及活性	4
支持方案 5 细胞运输的准备	5
单元 1.2 适于哺乳动物细胞的培养基	6
基本方案 1 制备含血清的培养基	6
基本方案 2 制备血清减量或无血清培养基	7
基本方案 3 HAT 选择培养基的制备	8
基本方案 4 转化细胞在软琼脂中的生长	9
支持方案 1 培养基中 pH 的调节	9
支持方案 2 抗生素在培养基中的应用	10
单元 1.3 细胞培养的无菌技术	11
基本方案 1 无菌技术	11
基本方案 2 层流式超净台的使用	12
单元 1.4 灭菌和过滤	13
基本方案 1 液体的高压灭菌	14
备择方案 干燥物品的高压消毒	15
基本方案 2 干热灭菌和清除热原法	16
基本方案 3 消毒剂的应用: 70%乙醇	16
溶液的过滤除菌	17
基本方案 4 真空过滤	17
基本方案 5 小体积非水溶性液体的正压过滤	18
单元 1.5 确定和控制细胞培养的微生物污染	19
基本方案 1 细菌和真菌污染的检测	19
基本方案 2 直接培养法检测支原体污染	21
基本方案 3 应用抗生素控制微生物污染	23
单元 1.6 酵母培养及培养基	24

培养基的制备	24
酵母培养的综合考虑	30
第 2 章 细胞的制备与分离	35
单元 2.1 成纤维细胞培养的建立	36
基本方案	36
单元 2.2 人淋巴细胞的制备和培养	40
基本方案 1 通过高分子质量的蔗糖-泛影钠 (Ficoll-Hypaque) 梯度离心制备淋巴细胞	40
基本方案 2 从淋巴细胞群里制备单核/巨噬细胞和树突状细胞	42
基本方案 3 通过包被在磁珠表面的单克隆抗体分选 T 细胞和 B 细胞	42
单元 2.3 人脐静脉内皮细胞的制备	44
基本方案	44
单元 2.4 转染 EB 病毒产生永生的 B 细胞株	45
基本方案	45
单元 2.5 激光捕获显微切割	46
基本方案 从组织切片中分离一种纯的细胞群	47
支持方案 苏木素和伊红染色组织的激光显微切割	49
第 3 章 亚细胞组分分离和细胞器分离	50
单元 3.1 细胞组分分离概述	51
单元 3.2 分离大鼠肝细胞质膜片层与浆膜结构域	59
基本方案 1 分离质膜片层	59
支持方案 1 检测碱性磷酸二酯酶 I 的活性	61
基本方案 2 分离质膜结构域	63
支持方案 2 K^+ 激活的对硝基苯酚磷酸酯酶活性测定实验	63
支持方案 3 $5'$ -核苷酸酶活性测定实验	64
支持方案 4 间接免疫荧光法检测与质膜片层相连的蛋白质	65
单元 3.3 利用差速及密度梯度离心法从组织和细胞中分离 Golgi 膜	66
基本方案 1 利用蔗糖密度筛从大鼠肝脏中快速分离 Golgi 膜	67
基本方案 2 将大鼠肝脏提取的轻线粒体组分悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离 Golgi 膜	68
基本方案 3 将培养的细胞悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离 Golgi 膜	69
基本方案 4 用自发形成梯度的 IODIXANOL 梯度液从肝细胞微粒体组分中分离 Golgi 膜	70
支持方案 测定 UDP-半乳糖半乳糖基转移酶	71
单元 3.4 利用差速离心及密度梯度离心从组织及细胞中分离溶酶体	72
基本方案 1 使用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液从大鼠肝脏中分离溶酶体	72
基本方案 2 利用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液从培养的人 HL-60 细胞中分离溶酶体	74
支持方案 1 酸性磷酸酶的测定	75
支持方案 2 β -N-乙酰葡萄糖胺酶的测定	76

单元 3.5 差速离心法从组织和细胞中分离线粒体	76
基本方案 1 用大鼠肝脏制备重线粒体组分	77
基本方案 2 牛心脏线粒体的大量制备	78
基本方案 3 用骨骼肌制备线粒体	79
基本方案 4 用培养的细胞制备线粒体	80
基本方案 5 用酵母菌(酿酒酵母)制备线粒体	80
单元 3.6 密度梯度离心法纯化粗线粒体组分	81
基本方案 1 用连续蔗糖梯度液分离大鼠肝脏的线粒体组分	82
基本方案 2 用非连续 PERCOLL 梯度液从大鼠脑分离线粒体	83
基本方案 3 用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液分离线粒体组分	84
支持方案 1 线粒体的琥珀酸脱氢酶分析	84
支持方案 2 溶酶体的 β -半乳糖苷酶分析	85
支持方案 3 过氧化物体的过氧化氢酶分析	86
单元 3.7 用差速离心法和密度梯度离心法从组织和细胞中分离过氧化物体	86
基本方案 1 从大鼠肝脏分离轻线粒体组分	87
基本方案 2 用预先形成的连续 IODIXANOL 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的 过氧化物体	88
基本方案 3 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的 过氧化物体	89
基本方案 4 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液从酵母原生质体分离过氧化物体	90
基本方案 5 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液从培养细胞 (HepG2) 分离过氧 化物体	91
支持方案 内质网标志酶 NADPH 细胞色素 c 还原酶的分析	92
单元 3.8 从哺乳动物组织中分离细胞核及核膜	93
基本方案 1 使用蔗糖密度筛从大鼠肝组织匀浆中分离细胞核	93
备择方案 使用 IODIXANOL 梯度液从动物或植物(麦芽)细胞中分离细胞核	94
基本方案 2 分离细胞核膜: 高离子强度的方法	95
基本方案 3 分离细胞核膜: 低离子强度的方法	96
支持方案 1 二苯胺检测 DNA	97
支持方案 2 苔黑素测定 RNA	97
支持方案 3 溴化乙锭测定 RNA 及 DNA	98
单元 3.9 酿酒酵母的亚细胞组分分离	99
基本方案 1 利用差速离心法分离原生质体组分	111
支持方案 应用酶解酶制备酵母原生质体	113
基本方案 2 应用 NYCODENZ 进行平衡密度梯度组分分离	114
基本方案 3 在蔗糖分级梯度液中进行 $P_{13\ 000}$ 膜的组分分离	116
基本方案 4 应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的囊泡	118
基本方案 5 应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的细胞核	120

基本方案 6	应用 NYCODENZ 分级梯度液分离乳糖诱导的线粒体	124
基本方案 7	用蔗糖分级梯度液分离油酸盐诱导的过氧化物酶体	127
基本方案 8	用蔗糖分级梯度液分离内质网	129
基本方案 9	用蔗糖分级梯度液从完整的酵母细胞中分离质膜	131
基本方案 10	从完整的酵母细胞中分离细胞溶胶	132
第 4 章	细胞生物学的工具——抗体	135
单元 4.1	单克隆抗体的制备	136
基本方案 1	制备单克隆抗体的免疫方法	136
基本方案 2	细胞融合与杂交瘤细胞的选择	137
支持方案 1	筛选原始杂交瘤上清	140
支持方案 2	杂交瘤细胞系的建立	140
支持方案 3	用有限稀释法进行克隆化培养	141
支持方案 4	制备克隆化/扩增培养基	142
单元 4.2	多克隆抗体的制备	142
基本方案	用弗式佐剂免疫产生多克隆抗体	142
备择方案	用其他佐剂免疫产生多克隆抗血清	144
支持方案	血清的制备	145
单元 4.3	免疫球蛋白 G 的纯化	145
基本方案 1	硫酸铵沉淀和分子筛层析	145
基本方案 2	蛋白 A 葡聚糖亲和层析	146
备择方案 1	蛋白 G 葡聚糖亲和层析	148
备择方案 2	抗大鼠 κ 链单克隆抗体结合的葡聚糖亲和层析	148
基本方案 3	以 Tris · Cl 为缓冲液的 DE52 离子交换层析	149
单元 4.4	抗体缀合物用于细胞生物学研究	150
基本方案	抗体与荧光团或生物素的结合	150
支持方案	估计抗体浓度的方法	155
第 5 章	显微镜术	156
单元 5.1	光学显微镜的校准及调节	157
光学显微镜的主要部件		158
亮视场与荧光显微镜术成像及 Kohler 照明光路的基础知识		162
基本方案 1	亮视场, 透射显微镜术的 Kohler 照明校准	164
基本方案 2	目镜的校准	166
基本方案 3	表面荧光显微镜 Kohler 照明模式的校准	166
基本方案 4	相差显微镜术的校准	167
支持方案	显微镜光学部件的维护及清洗	169
单元 5.2	荧光显微镜术	170
荧光显微镜光学系统		170
荧光显微镜部件		171
数字化暗室		174

单元 5.3 免疫荧光染色	175
基本方案 培养细胞的免疫荧光标记	175
单元 5.4 荧光染料及荧光脂类衍生物标记细胞器	177
基本方案 1 固定细胞的内质网染色	179
备择方案 活细胞内内质网染色	180
基本方案 2 活细胞内高尔基复合体染色	180
基本方案 3 线粒体染色	182
单元 5.5 基本共聚焦显微镜术	183
光切基础	183
共聚焦显微镜的类型	184
应用指南	187
单元 5.6 用免疫过氧化物酶方法定位培养细胞和组织的抗原	191
计划策略	192
基本方案 1 培养细胞的免疫过氧化物酶染色	192
基本方案 2 组织的免疫过氧化物酶染色	194
单元 5.7 低温免疫金电子显微镜技术	196
基本方案 免疫金标记	197
支持方案 1 用免疫金标记方法固定细胞	198
支持方案 2 用免疫金标记方法固定组织	198
支持方案 3 免疫金标记方法做冰冻切片	199
支持方案 4 经碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格的准备	200
单元 5.8 相关的视频光学/电子显微镜术	201
基本方案 相关的视频光学/电子显微镜术	201
单元 5.9 活细胞内微管和肌动蛋白丝的荧光斑点显微镜技术 (FSM)	205
计划策略	205
基本方案 1 设计一个时延数字化 FSM 显微镜系统	206
基本方案 2 活细胞内细胞骨架的时延 FSM 成像	210
基本方案 3 时延 FSM 系列影像的定性和定量分析	212
支持方案 1 FSM 荧光标记的微管蛋白的制备	213
支持方案 2 FSM 荧光标记肌动蛋白的制备	216
单元 5.10 作为活细胞影像工具的 GFP	219
制备融合蛋白	219
第 6 章 细胞蛋白质的特性	225
单元 6.1 膜结合蛋白质的分析	226
基本方案 1 碱性碳酸盐提取	226
备择方案 1 尿素提取	227
备择方案 2 高盐提取	227
备择方案 3 Triton X-114 相位分离	227
支持方案 Triton X-114 预浓缩	228