



同济大学本科教材出版基金资助



生命科学综合实验

主编 吕立夏



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

生命科学综合实验

主 编 吕立夏



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

以科学实验研究为基础的生命科学,发展迅速,处于当今科学发展的最前沿,为其他各个相关领域的研究提供了最强大的技术支持。本书为整合课程改革实践后的新版教程,主要介绍细胞生物学、生物化学、分子生物学、医学遗传学实验的基本原理和操作,分为基础篇和综合篇两部分,共 20 个实验项目。指导学生掌握基本的实验操作技能,并引导学生在实践中将理论与科研、临床应用充分结合。

本书适合高等医学院校临床医学五年制、八年制本科生和口腔医学专业学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学综合实验/吕立夏主编. —上海:同济大学出版社,2016.1

ISBN 978-7-5608-6194-4

I. ①生… II. ①吕… III. ①生命科学—实验—医学院校—教材 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 021433 号

生命科学综合实验

吕立夏 主编

责任编辑 赵 黎 责任校对 张德胜 封面设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn
(上海市四平路 1239 号 邮编 200092 电话 021-65985622)

经 销 全国各地新华书店

印 刷 江苏凤凰数码印务有限公司

开 本 787 mm×1 092 mm 1/16

印 张 10.5

字 数 262 000

版 次 2016 年 1 月第 1 版 2016 年 1 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-6194-4

定 价 28.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究

编委会成员

主 编 吕立夏

副主编 李 姣 邵志华 李 丽

编 委 吕立夏 高芙蓉 金彩霞 田海滨

李 丽 李 姣 张介平 王 娟

张敬法 郭 峰 沙继宏 邵志华

徐晶莹 徐 磊 史秀娟

(编委单位为同济大学医学院)

前言

随着生命科学的迅速发展,学科交叉越来越多。自 2010 年开始,我们对生命科学相关课程的实验进行改革,建立“生命科学综合实验”课程,对细胞生物学、生物化学、分子生物学和遗传学等实验的内容进行整合和更新,包括验证型实验、综合型实验和探究型实验 3 个层次,学时比为 5 : 3 : 4,形成一套独立、完整又相互衔接的实验课程体系。学生经过基础型实验的学习,掌握基本的细胞生物学、生物化学、分子生物学和遗传学研究方法。经过综合实验的过渡,初步培养综合运用各类技术手段的能力。在此基础上,通过研究性实验,熟悉生命科学研究的基本过程,培养严谨的科研思想方法。

在实验课程的内容设置中,验证型实验以基本实验技能为主,包括显微镜基本使用、细胞周期、细胞培养和细胞融合等细胞学基本技术,比色、离心、电泳、层析等生物化学基本技术,以及核型分析等医学遗传学基本技术,新增综合性实验两项:第一项是骨髓间充质干细胞的成脂分化,通过对间充质干细胞的分离、纯化、培养、诱导分化,通过简单的油红 O 染色,直观地观察到细胞从间充质干细胞分化到脂肪细胞,加深对于细胞生物学理论的理解;第二项是临床生化综合实验,通过化学诱导建立糖尿病大鼠模型,比较正常大鼠和糖尿病大鼠血糖和血脂的变化及其激素对血糖和血脂的影响,在整体水平上理解三大物质代谢之间的相互联系。在实验课的第三层次,设计了一个“microRNA-X 的克隆与功能分析”的探究型实验,融入生物信息的预测,涵盖了细胞生物学和分子生物学技术的综合应用。该探究实验从科研的热点领域“表观遗传学”出发,选择微小 RNA 为探究对象,首次将

生物信息学实验整合入实验中,有机地将“干实验(生物信息学实验)”与“湿实验”联系起来。

本书“以学生为中心,以能力培养为导向”,秉承“将一流的科研成果转化为优质的教学资源”的教学理念,将创新精神与能力的医学专门人才作为核心培养目标,对生命科学(细胞生物学、生物化学、分子生物学、分子遗传学和遗传学)实验的内容进行整合和更新,希望能够让医学生的实践学习受益终身。

为完成这本实验教材,全体参编教师付出了辛勤的劳动,在教改和课程整合的过程中,每一个细节都亲力亲为,保证了实验操作的可靠性。因为经费、仪器和时间有限,编写中难免存在不完善、不周全之处,敬请各位同行专家和学生提出宝贵意见,我们将本着实事求是、渴望进步的积极心态不断改进,力求使其成为与时俱进、不断提高医学生能力的优秀教材。

主 编

2015年11月

目 录

第一部分 基础篇

实验 1-1 显微镜的使用及细胞周期	3
实验 1-2 细胞传代培养及细胞融合	16
实验 1-3 骨髓间充质干细胞原代培养与定向分化	21
实验 1-4 人染色体核型分析	26
实验 1-5 分光光度法——双缩脲法、BCA 法和考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	32
实验 1-6 层析法	42
实验 1-6(1) 凝胶层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	52
实验 1-6(2) 离子交换层析分离混合氨基酸	55
实验 1-7 碱性磷酸酶米氏常数的测定	58
实验 1-8 离心法——适应性免疫反应——淋巴细胞分离及鉴定	63
实验 1-8(1) 单个核细胞的分离——密度梯度离心法	65
实验 1-8(2) 淋巴细胞的鉴定——B 淋巴细胞数量检测	68
实验 1-9 电泳法——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离混合蛋白质	71
实验 1-10 正常和糖尿病大鼠血糖和血脂的检测及激素对血糖的影响	85
实验 1-11 人类黏膜上皮细胞基因组 DNA 的抽提及 ACE 基因多态性 检测	91

第二部分 综合篇

实验 2-1 生物信息学基本实验	97
实验 2-2 miRNA-X 的克隆及其功能分析	113
实验 2-2(1) 对特定 miRNA-X 的生物信息学分析	118

实验 2-2(2) 人工合成 shRNA 与 pSuper 载体的体外连接与转化 119

实验 2-2(3) 重组质粒 DNA 的抽提纯化、鉴定及测序 125

实验 2-2(4) 转染真核细胞及 CCK-8 法检测对细胞活力的影响..... 131

实验 2-2(5) RNA 的抽提纯化、鉴定及 RT-PCR 136

实验 2-2(6) Western blot 对特定蛋白表达的检测 146

参考文献 156

第一部分

基 础 篇

实验 1-1

显微镜的使用及细胞周期

实 验 目 的

1. 熟悉光学显微镜的主要构造及其性能。
2. 掌握低倍镜和高倍镜的正确使用方法。
3. 掌握生物绘图的基本方法。
4. 了解临时装片的制作。
5. 了解显微结构测量的基本方法。
6. 掌握细胞周期各阶段的特征,主要是细胞核和染色体的变化。
7. 了解动植物细胞有丝分裂的异同。

实 验 原 理

一、光学显微镜的结构和使用

1. 光学显微镜的结构

光学显微镜是由机械部分、光学放大部分和照明部分组成。机械部分一般包括镜筒、物镜转换器、标本移动器、焦距调节器、载物台、镜臂和底座等;光学放大部分一般包括接目透镜、接物透镜、反射棱镜等;照明部分一般包括电光源部件、反光镜、集光器等(图 1-1-1)。

1.1 机械部分

1.1.1 镜筒是安装在镜臂上部的圆筒形部件。在其上端安装接目透镜,下端安装接物透镜。现代的光学显微镜一般不把接物透镜直接安装在镜筒上,而是通过物镜转换器间接安装在镜筒上,以便于换用不同放大倍率的物镜。

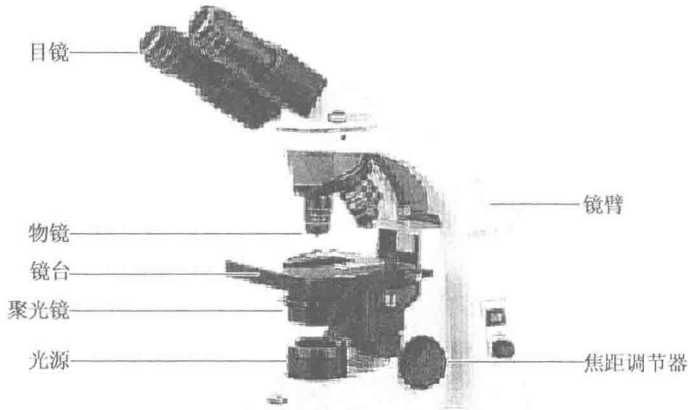


图 1-1-1 光学显微镜结构图

1.1.2 物镜转换器是安装在镜筒下端的可旋转的圆盘状部件,上有 3~6 个带内螺纹的圆孔。接物透镜即安装在这些圆孔中,旋转物镜转换器可以方便地换用不同接物透镜。换用物镜时,手持转盘的边缘转动。

1.1.3 标本移动器现代光学显微镜通常都装有标本移动器,使观测过程中的标本移动既便捷又准确。标本移动器一般有两种:一种是载物台上的一种附加装置,在工作过程中直接移动标本;而另一种则与载物台连为一体,工作中并不直接移动标本,而是水平移动载物台,从而间接移动标本。标本移动器几乎都装有游标刻度尺,以方便标本的准确定位。

1.1.4 焦距调解器是安装在镜臂或镜柱上的机械调节装置,用以调节镜臂与载物台之间的垂直位置,从而改变标本与接物透镜下表面的距离,以使物镜的焦平面与标本平面重叠,即调节焦距。焦距调解器有两个旋钮,大的用以快速而粗略的调节,故称粗调旋钮;小的则可以精细调节焦距,即细调旋钮。两个旋钮同轴安装,外圈是粗调旋钮,中央的小旋钮是细调旋钮。通常在细调旋钮上有刻度(每小格 $1\ \mu\text{m}$ 或 $2\ \mu\text{m}$),可用以对标本作垂直测量。

1.1.5 载物台也称镜台,是安装或固定在镜臂下方的宽大平台,用以放置被观测标本。载物台的中央有一通光孔,可让照明光线从标本下方照射到标本上,再透过标本投射到接物透镜。

1.1.6 镜座是整个显微镜的基座,支持着整个镜体。镜座通常呈马蹄形或长方形,镜柱连接其上。

1.1.7 镜柱直立于镜座上,连接并支持镜臂、载物台、集光器等部件。

1.1.8 镜臂的下部连接镜柱,上部连接镜筒,通常有一定的弯曲。较新型的显微

镜的镜柱和镜臂连为一体,载物台与其升降调节结构装于其上。

1.2 光学放大部分

1.2.1 接物透镜简称物镜。物镜是由数片凸透镜和凹透镜精密组合胶结而成的透镜组,固定在金属镜筒中。物镜筒上端具有螺纹,以便旋装在物镜转换器上。物镜是决定光学显微镜性能的最关键部件,因而物镜的选择、使用和保养就成了光学显微镜使用的关键。尤其要注意保护透镜,原因之一是透镜由多片胶合而成,很容易因脱胶而报废;之二是透镜为了减少反射增加透射而在表面镀有增透膜,增透膜极易被擦伤。所以,按规程保养物镜非常重要。

1.2.2 接目透镜简称目镜。常用的目镜由两片透镜组成,固定在金属镜筒上。在两片透镜之间或下透镜的下方装有一环状金属片,称视场光阑;其位置在目镜的焦平面上,并决定视场的大小,以遮挡视场以外的散射光。在显微测量中,目镜测微尺即安装其上。

1.2.3 反射棱镜光学显微镜载物台不能倾斜,物镜始终垂直,而目镜则保持约 45° (或小些)倾角。因此,在目镜与物镜之间装有一多棱反射镜。

1.3 照明部分

照明部件是用来照明标本的。光学显微镜所使用的光源可分为自然光源和人工光源两种。光学显微镜随使用光源的种类的不同,照明部件也有所不同,使用时需加注意。

1.3.1 电光源部件中高档的光学显微镜都在镜座上装有电光源部件,以摆脱对自然光的依赖,并可产生较理想的平面光源效果。

1.3.2 反光镜低档的光学显微镜多使用自然光源。可使用自然光源的显微镜在载物台下装有一反光镜。通常使用的反光镜为双面镜,一面是平面镜,另一面是凹透镜。反光镜安装在一个万向轴上,可 360° 自由旋转。平面镜仅改变入射光线的投射角度,而凹面镜则可以聚集入射光线。

1.3.3 集光器是光学显微镜获得良好照明不可或缺的重要部件。集光器决定了投射到标本上的光线的性质、会聚点的位置、成像的反差及亮度,甚至可能直接影响分辨率。因而,集光器的质量和使用将直接影响显微成像的质量。集光器一般有集光镜、集光镜光阑和集光镜调节器 3 个部件。

① 集光镜多由数片透镜组合而成。整体作用相当于一个凸透镜。其作用是汇聚照明光线至标本平面,以得到最佳照明。

② 光阑现代集光镜都装有可以连续平滑调节集光镜通光孔径大小的光阑,由于其调节方式类似于人眼瞳孔,故称之为虹彩光阑。光阑通过一个调节环或调节手柄控制光阑通光孔径。好的集光器光阑调节装置还标明通光孔径的刻度,以便与物镜密切配

合。光阑的作用是调节集光镜的通光孔径,而集光镜的通光孔径直接影响显微镜的整体分辨力和成像的反差。

③ 集光镜调节器通常固定在镜臂或镜座上,集光镜则安装在集光镜调节器上。集光镜调节器有一个调节旋钮,用以调节集光镜与标本间的相对位置,从而使得照明光线聚焦在标本平面上,以得到最佳照明。

2. 光学显微镜的基本原理

标本的放大主要由物镜完成,物镜放大倍数越大,它的焦距越小。焦距越小,物镜的透镜和玻片之间的距离(工作距离)也小。油镜的工作距离很短,使用时需格外注意。目镜只起放大作用,不能提高分辨率,标准目镜的放大倍数是 10 倍。聚光镜能使光线照射标本后进入物镜,形成一个大角度的锥形光柱,因而对提高物镜分辨率是很重要的。聚光镜可以上下移动,以调节光的明暗,可变光阑可以调节入射光束的大小。

显微镜的放大效能(分辨率)是由所用光波长和物镜数值孔径决定,缩短使用的光波波长或增加数值孔径可以提高分辨率,可见光的光波幅度比较窄,紫外光波长短可以提高分辨率,但不能用肉眼直接观察。所以,利用减小光波长来提高光学显微镜分辨率是有限的,提高数值孔径是提高分辨率的理想措施。要增加数值孔径,可以提高介质折射率,空气为介质时折射率为 1,而香柏油的折射率为 1.51,与载片玻璃的折射率(1.52)相近,这样,光线可以不发生折射而直接通过载片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率。另外,显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积,而物镜的放大倍数越高,数值孔径越大,分辨率也越高。

3. 光学显微镜的使用方法

3.1 低倍镜观察

先将低倍物镜的位置固定好,然后放置标本片,调好光线,将物镜提高,向下调至看到标本,再用细调对准焦距进行观察。除少数显微镜外,聚光镜的位置都要放在最高点。如果视野中出现外界物体的图像,可以将聚光镜稍微下降,图像就可以消失。聚光镜下的虹彩光圈应调到适当的大小,以控制射入光线的量,增加明暗差。

3.2 高倍镜观察

显微镜的设计一般是共焦点的。低倍镜对准焦点后,转换到高倍镜基本上也对准焦点,只要稍微转动微调即可。虹彩光圈要放大,使之能形成足够的光锥角度。稍微上下移动聚光镜,观察图像是否清晰。

3.3 油镜观察

油镜的工作距离很小,所以要防止载玻片和物镜上的透镜损坏。使用时,一般是经低倍物镜、高倍物镜到油镜。当高倍物镜对准标本后,再加油镜观察。载玻片标本也可以不经过低倍物镜和高倍物镜,直接用油镜观察。显微镜有自动止降装置的,载玻片上

加油以后,将油镜下移到油滴中,到停止下降为止,然后用微调向上调准焦点。没有自动止降装置的,对准焦点的方法是从显微镜的侧面观察,将油镜下移到与载玻片稍微接触为止,然后用微调向上提升调准焦点。

使用油镜时,镜台要保持水平,防止油流动。油镜所用的油要洁净,聚光镜要提高到最高点,并放大聚光镜下的虹彩光圈,否则会降低数值孔径而影响分辨率。无论是油镜或高倍镜观察,都宜用可调节的显微镜灯作光源。

4. 光学显微镜的重要概念和术语

4.1 镜筒长度 从镜筒的上缘到物镜肩部之间的距离,就是镜筒长度。显微镜镜筒长度大多为 160 mm,少数为 170 mm,个别牌号的镜筒长度可以调节,便于配合多种物镜。

4.2 物镜的工作距离 物镜的下表面到盖玻片上表面之间的距离。每种型号的物镜都有特定的工作距离,必要时,可参考产品说明。

4.3 物镜的分辨力 分辨力也称分辨率。物镜的分辨力用其可以分辨的两相邻物点的最小距离表示。如果物镜的分辨力低,即使有较高的放大倍率,也无法得到清晰的物像,这样的放大被称为无效放大。普通光学显微镜的理论分辨力最高也只能达到 0.2 μm ,所以无法分辨如细胞膜(0.01 μm 厚)这样的结构(表 1-1-1)。

表 1-1-1 标准物镜的特性

放大倍率	物镜的数值孔径/NA	工作距离/mm
10	0.20	6.5
20	0.50	2.0
40	0.65	0.6
100	1.25	0.2

4.4 低倍镜、高倍镜、油镜 通常依物镜的放大倍率把物镜分成三类:放大倍率为 10~20 倍的为低倍物镜,简称低倍镜;放大倍率为 20~60 倍的为高倍物镜,简称高倍镜;放大倍率为 60 倍以上的物镜,需要用镜油作光学介质,所以称作油镜。

4.5 物镜与标本之间的光学介质最常用的有空气、杉木油和水。影响物镜的分辨力的因素主要有三个:物镜的数值孔径、照明光的波长和光学介质的折射率。其中光学介质的折射率与物镜的分辨力成正比。因此,当物镜的放大倍率很高时,为了避免无效放大,就要使用高折射率的介质,以提高分辨率。

5. 光学显微镜的保养

显微镜是精密贵重的仪器,必须很好地保养。显微镜用完后要放回原来的镜箱或镜柜中,同时要注意下列事项:

5.1 移动显微镜时,务必将显微镜提起再放至适当位置,严禁推动显微镜,应一手握住镜臂,另一手托住镜座,保持整个镜身的平稳。

5.2 转动旋转盘时,务必将载物台降至最低点,避免因操作不当而刮伤镜头。

5.3 标本染色或其他任何操作皆应将玻片取下,操作完成后,再放回载物台观察,切勿在载物台上操作,以免染剂或其他液体流入显微镜内部或伤及镜头。

5.4 观察完一种材料,欲更换另一种材料时,务必将载物台下降至最低点,换好玻片后,再依标准程序重新对焦,切勿直接抽换标本,以免刮伤镜头或玻片标本。

5.5 若长期不使用,应以二甲苯清洁所有镜头。

5.6 镜头要保持清洁。显微镜使用前后,皆应以拭镜纸清洁所有镜头,擦拭时,应从中心向边缘作螺旋线移动。可选用不同的溶剂,如酒精、丙酮和二甲苯等,其中最安全的是二甲苯。方法是用拭镜纸蘸取少量的二甲苯,轻擦。目镜是否清洁可以在显微镜下检视。转动目镜,如果视野中可以看到污点随着转动,则说明目镜已沾有污物,可用擦镜纸擦拭目镜。如果还不能除去,再擦拭下面的透镜。

6. 显微镜使用完毕后的整理

显微镜用完后,转动粗调旋钮提升镜筒或降下载物台,取下标本并放回标本盒。转动物镜转换器,使物镜离开光路。擦净显微镜各部位可能粘有的污物。放下镜筒或提升载物台,使物镜接近载物台。转动反光镜使之垂直。关闭虹彩光阑,降下集光器。如果镜臂倾斜则复原之。把标本移动器置中。最后把显微镜放回镜箱或指定的地方。

二、生物绘图的基本方法

1. 图的大小适当,在纸上的位置要适中,一般稍偏向左上方,以便在右侧或左下方留出注字和写图名的地方。

2. 先用削好的铅笔(一般用 3H),根据观察如实画出图像。

3. 图中明暗用细点表示,越暗的地方细点越多。不能用阴影、斜线表示暗处。

4. 标柱尽量在图的右侧,并用尺引出水平指示线。

5. 在图的下方写上所画图像的物种和名称。

6. 图上要有比例尺,以表示各部的大小。

三、显微测量

1. 目微尺和台微尺简介

细胞的大小是细胞重要的形态特征之一,由于细胞很小,只能在显微镜下测量。用于测量细胞大小的工具有目镜测微尺和镜台测微尺。

目镜测微尺(图 1-1-2)简称目微尺,是一块圆形玻片,在玻片中央把 5 mm 长度分成 50 等分,或把 10 mm 长度分成 100 等分。测量时,将其放在接目镜中的隔板上(此处正好与物镜放大的中间像重叠)来测量经显微镜放大后的细胞物像。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同,目镜测微尺每格实际表示的长度也不一样,因此,目镜测微尺测量细胞大小时,须先用置于镜台上的镜台测微尺校正,以求出在一定放大倍数下目镜测微尺每小格所代表的相对长度。

镜台测微尺(图 1-1-3)简称台微尺,是中央部分刻有精确等分线的载玻片,一般将 1 mm 等分为 100 格,每格长 $10\ \mu\text{m}$ (即 $0.01\ \text{mm}$),它是专门用来校正目镜测微尺的。校正时,将镜台测微尺放在载物台上。

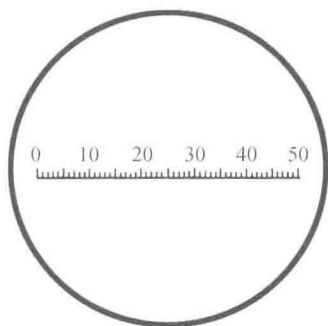


图 1-1-2 目镜测微尺

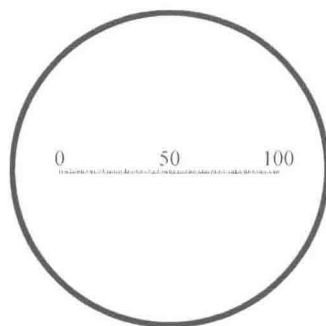


图 1-1-3 镜台测微尺

由于镜台测微尺与细胞标本是处于同一位置,都要经过物镜和目镜的两次放大成像进入视野,即镜台测微尺随着显微镜总放大倍数的放大而放大,因此,从镜台测微尺上得到的读数就是细胞的真实大小,所以用镜台测微尺的已知长度在一定放大倍数下校正目镜测微尺,即可求出目镜测微尺每格所代表的长度,然后移去镜台测微尺,换上待测标本片,用校正好的目镜测微尺在同样放大倍数下测量微生物大小。

2. 显微测量的基本方法

2.1 目镜测微尺的校正

把目镜上的透镜旋下,将目镜测微尺的刻度朝下轻轻地装入目镜的隔板上,把镜台测微尺置于载物台上,刻度朝上。先用低倍镜观察,对准焦距,视野中看清镜台测微尺的刻度后,转动目镜,使目镜测微尺与镜台测微尺的刻度平行,移动推动器,使两尺重叠,再使两尺的“0”刻度完全重合,定位后,仔细寻找两尺第二个完全重合的刻度(图 1-1-4),计数两重合刻度之间目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。

因为镜台测微尺的刻度每格长 $10\ \mu\text{m}$,所以由下列公式可以算出目镜测微尺每格所代表的长度。