



高中生物学实验 培训教程

主编 邢福 王丽



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高中生物学实验 培训教程

主编

邢 福 王 丽

编者（以姓氏笔画为序）

王秀莉 由继红 邢 福 刘东波 李 凡

李凤霞 房金波 邸 瑶 陈 珊 赵世萍

夏洪梅 黄国辉 董春光

Gaozhong Shengwuxue Shiyān Peixun Jiaocheng



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本教程涵盖了“普通高中课程标准实验教科书”生物必修1、必修2、必修3和选修1的全部实验内容，是在总结了两轮高中生物学教师实验培训经验的基础上完成的，可操作性强，实验关键环节明确，教学建议到位，背景知识丰富。其中，许多能够提高实验效果的“技巧”或者“改进”都充分编写到本书中。另外，同一实验尽可能给出多种实验方法和实验材料，供教师根据实验室条件自行选择。

本教程可有效地指导高中生物学教师准备实验、顺利完成实验教学过程，获得理想的实验效果，实现实验教学目标。适用于高中生物学教师、生物科学专业师范类本科生以及高中生物学教学研究人员。

图书在版编目(CIP)数据

高中生物学实验培训教程 / 邢福, 王丽主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2013. 12
ISBN 978-7-04-038203-7

I. ①高… II. ①邢… ②王… III. ①生物课-实验-高中-教材 IV. ①G634.911

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 218944 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 王 莉 封面设计 张 楠 责任印制 张泽业

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	北京佳信达欣艺术印刷有限公司	网上订购	http://www.landracom.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landracom.com.cn
印 张	9.75		
字 数	230 千字	版 次	2013 年 12 月第 1 版
彩 插	2	印 次	2013 年 12 月第 1 次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	21.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 38203-00

前言

按照 2003 年教育部颁布的“普通高中生物课程标准”，高中生物学教材中的实验内容有较大幅度的变动——实验的数量增加、难度加大，同时对实验室仪器设备条件的要求也更高了。为尽快适应新课程标准、顺利完成实验教学任务，高中生物学教师提出了进行实验教学培训的迫切要求。于是，一向以培养生物学师资而享誉国内的东北师范大学生命科学学院欣然承担了这项培训任务，举办了两轮高中生物学教师实验培训，共有近 300 名中学教师接受了系统的实验培训。本教程就是在总结培训经验的基础上编写的。

本教程的实验项目基本涵盖了“普通高中课程标准实验教科书”生物必修 1、必修 2、必修 3 和选修 1 的全部实验内容。每个实验项目都由编者亲自操作（个别非操作性的实验除外）、反复研究，对于实验方法、步骤做了细致的推敲。许多能够提高实验效果的“技巧”或者“改进”毫不保留地都编写到了本教程中。例如，在验证“细胞大小与物质运输的关系”实验中，我们给出了自制琼脂球的方法，实验效果很好。在每个实验项目中都给出了“注意事项与教学建议”，对实验中容易出现的问题给出了具体的建议。在某些实验项目中列举了多种实验方法和实验材料，供教师根据实验室条件和实际需要加以选择。例如，在“DNA 的粗提取与鉴定”实验中，我们发现鸡血并不是最好的实验材料，香蕉和冰冻菜花作为实验材料更理想，实验操作简单，结果易得。单独列出的“背景知识”和“实验原理”有助于拓展知识面和更深入地理解该实验项目的科学意义。另外，降低成本、减少污染也是我们选择实验材料与实验方法时考虑的一个原则。本教程适合高中生物学教师、生物科学专业师范类本科生、准备从事高中生物学教学的本科生和研究生，以及高中生物学教学研究人员参考使用。

本教程实验一、六、十二、二十六至二十八由王秀莉编写；实验二至五、十三至十五、二十九、三十由李凤霞、赵世萍编写；实验十、十一、十六至十八由由继红编写；实验七、实验八、附录二、附录三由黄国辉编写；实验九由夏洪梅编写；实验十九、二十二由邢福编写；实验二十、二十一、二十三至二十五由李凡编写；实验三十一、三十二由房金波、邸瑶编写；实验三十三至三十六由陈珊、夏洪梅编写；实验三十七至四十由刘东波、夏洪梅编写；附录一由夏洪梅、邸瑶、赵世萍、王秀莉、由继红、黄国辉编写；线条图由董春光绘制；照片由相应实验的编者提供（标注引用的除外）。全书由王丽策划，邢福统稿。

限于编者水平，书中错误和疏漏不可避免，希望读者提出宝贵意见，以便进一步完善。

编者
2013 年 6 月

第一篇 必修实验

实验一	检测生物组织中的糖类、脂肪和蛋白质	3
实验二	观察 DNA 和 RNA 在细胞内的分布	7
实验三	细胞膜的制备方法	9
实验四	细胞的荧光标记与融合检测细胞膜的流动性	11
实验五	植物叶片细胞叶绿体、线粒体的观察	15
实验六	植物细胞的吸水和失水	16
实验七	比较过氧化氢在不同条件下的分解	18
实验八	影响酶活性的条件	20
实验九	探究酵母菌的呼吸方式	24
实验十	绿叶中色素的提取和分离	26
实验十一	环境因素对光合作用强度的影响	29
实验十二	细胞大小与物质运输的关系	31
实验十三	植物细胞有丝分裂的制片与观察	34
实验十四	蝗虫减数分裂的制片与观察	37
实验十五	诱导植物染色体数目的变化	40
实验十六	生物体维持 pH 稳定的机制	43
实验十七	生长素的极性运输	45
实验十八	生长素类似物促进插条生根的最适浓度	47
实验十九	用样方法调查草地中某种双子叶植物的种群密度	50
实验二十	培养液中酵母菌种群数量的变化	53
实验二十一	土壤微生物的分解作用	56
	(一) 土壤微生物对落叶的分解作用	57
	(二) 土壤微生物对淀粉的分解作用	58
实验二十二	设计制作生态缸并观察其稳定性	60

第二篇 选修实验

实验二十三	果胶酶在果汁生产中的应用	65
实验二十四	探究加酶洗衣粉的洗涤效果	68

目 录

(一) 普通洗衣粉和加酶洗衣粉对污渍洗涤效果的比较	69
(二) 加酶洗衣粉使用时最适温度的确定	70
(三) 不同种类加酶洗衣粉洗涤效果的比较	71
实验二十五 酵母细胞的固定化	73
实验二十六 DNA 的粗提取与鉴定	76
实验二十七 聚合酶链反应扩增 DNA 片段	79
实验二十八 血红蛋白的提取和分离	82
实验二十九 菊花的组织培养	85
实验三十 月季的花药培养	88
实验三十一 植物芳香油的提取	92
实验三十二 胡萝卜素的提取	95
实验三十三 果酒和果醋的制作	97
实验三十四 腐乳的制作	100
实验三十五 制作泡菜并检测亚硝酸盐含量	102
实验三十六 实验室常用的消毒和灭菌方法	106
实验三十七 制备牛肉膏蛋白胨固体培养基	109
实验三十八 大肠杆菌的纯化	112
实验三十九 土壤中分解尿素的细菌的分离与计数	116
实验四十 分解纤维素的微生物的分离	119
参考文献	122
附录	125
一、生物学实验常用试剂与培养基的制备方法	125
二、生物学实验室常用仪器原理、功能与操作方法	132
三、生物学实验室安全常识	143



第一篇

必修实验

实验一 检测生物组织中的糖类、脂肪和蛋白质

§ 背景知识

生物组织中含有糖类、脂质和蛋白质等有机化合物。糖类化合物是一切生物体维持生命活动所需能量的主要来源，是生物体合成其他化合物的基本原料，有时还充当结构性物质。糖类的分类方法很多，如按其组成不同，可分为单糖、寡糖和多糖；按其是否具有还原性，可分为还原性糖和非还原性糖。分子内含有还原性基团（游离醛基或游离酮基）的糖称为还原糖，常见的有葡萄糖、果糖、麦芽糖；分子内没有游离的半缩醛羟基，不具有还原性的糖叫做非还原性糖，如蔗糖。

淀粉是葡萄糖的高聚体，分为直链淀粉和支链淀粉两类。淀粉作为营养成分主要储存在植物的种子和块茎中，各类植物中的淀粉含量都较高。

脂质是生物体内一大类重要的有机化合物，它们不溶于水，但溶于非极性有机溶剂。脂质是生物体的重要代谢燃料，是储存能量的主要形式，有的脂质还有防止机械损伤和热量散失的作用。生物体含有的脂质主要包括脂肪（三酰甘油）、磷脂、糖脂和固醇等。

蛋白质是一切生物体细胞和组织的主要组成部分，也是生物体形态结构的物质基础，它与生命及各种形式的生命活动紧密关联，机体中的每一个细胞及其重要组成部分都有蛋白质的参与，可以说没有蛋白质就没有生命。

§ 实验目的

初步掌握鉴定生物组织中还原糖、淀粉、脂肪和蛋白质的基本方法。

§ 实验原理

1. 还原糖的鉴定原理

费林试剂由 0.1 g/mL 的氢氧化钠溶液和 0.05 g/mL 的硫酸铜溶液组成，二者混合，可生成淡蓝色的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀， $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 与还原糖的还原性基团在加热的条件下反应，能够生成砖红色的 Cu_2O 沉淀，而还原性糖本身则氧化成相应的糖酸。

2. 脂肪的鉴定原理

苏丹Ⅲ或苏丹Ⅳ在脂肪中的溶解度比在乙醇中的溶解度大，当用苏丹Ⅲ或苏丹Ⅳ的乙醇溶液处理含有脂肪的生物组织时，乙醇中的苏丹Ⅲ或苏丹Ⅳ进入脂肪中。苏丹Ⅲ染液遇脂肪的颜色反应为橘黄色，苏丹Ⅳ染液遇脂肪的颜色反应为红色。因为苏丹Ⅳ染液与脂肪的亲合力比较强，所以染色的时间应比较短，一般为 1 min 左右，而苏丹Ⅲ染色需要 3 min 左右。

3. 蛋白质的鉴定原理

双缩脲试剂的成分是 0.1 g/mL 的氢氧化钠溶液和 0.01 g/mL 的硫酸铜溶液。在碱性溶液中，双缩脲 ($\text{H}_2\text{NOC}-\text{NH}-\text{CONH}_2$) 能与 Cu^{2+} 作用，形成紫色或紫红色的络合物，这个反应叫做双缩脲反应。由于蛋白质分子中含有很多与双缩脲结构相似的肽键，因此，蛋白质可与双缩脲试剂发生颜色反应。

§ 仪器、材料和试剂

1. 仪器

单面刀片，试管（最好有刻度），试管架，试管夹，大、小烧杯，小量筒，酒精灯，研钵，三脚架，石棉网，培养皿，火柴，载玻片，盖玻片，毛笔，吸水纸，水浴锅，显微镜。

2. 材料

苹果或梨，马铃薯，花生种子，豆浆，鲜动物肝，鸡蛋。

3. 试剂

(1) 费林试剂 使用时临时配制，将 1 mL 0.05 g/mL 的硫酸铜溶液与 1 mL 0.1 g/mL 的氢氧化钠溶液混合，配完后立即使用。

(2) 苏丹Ⅲ溶液 称取 0.1 g 苏丹Ⅲ干粉，溶于 100 mL 95% 的乙醇中，待全部溶解后再使用。

(3) 苏丹Ⅳ溶液 称取 0.1 g 苏丹Ⅳ干粉，溶于 50 mL 丙酮中，再加入 50 mL 70% 的乙醇，充分混合后即可使用。

(4) 双缩脲试剂 0.1 g/mL 的氢氧化钠溶液和 0.01 g/mL 的硫酸铜溶液。

(5) 碘液 将 2 g 碘化钾溶于 10 mL 蒸馏水中，加入 1 g 碘使之溶解，待药品溶解后，加水至 300 mL，在棕色瓶中保存。

§ 方法与步骤

首先让同学们选择实验材料，每小组从老师提供的实验材料中选择，预测其中含哪些有机化合物，再选择所需要的仪器和试剂。如果判断不好实验材料中所含的有机化合物，不妨将所有的实验材料都用来做所有的实验。最后通过对实验结果的观察得出结论，再与之前的预测进行比较，判断实验结果是否正确。

1. 还原糖的检测和观察

(1) 首先将水浴锅温度调至 65 ℃，并开始加热。

(2) 选择实验材料，将需要研磨的材料进行研磨，然后向试管内注入 2 mL 研磨好的组织样液。

(3) 配制费林试剂，然后向装有组织样液的试管中注入 1 mL 费林试剂。

(4) 将试管放入 65 ℃ 温水浴锅中约 10 min。

(5) 观察试管中出现的颜色变化，比较不同材料呈现的颜色变化是否相同，并进行记录。

2. 淀粉的检测和观察

(1) 选择实验材料，将需要研磨的材料进行研磨，然后向试管内注入 2 mL 研磨好的组织样液。

(2) 向试管内滴加 2 滴碘液，观察颜色变化，比较不同材料呈现的颜色变化是否相同。

将变成蓝色的溶液加热后再冷却，观察颜色变化，并进行记录。

3. 脂肪的检测和观察

方法一：将需要匀浆的实验材料进行研磨，取 2 mL 研磨好的组织样液注入试管，向待测组织样液中滴加 3 滴苏丹Ⅳ染液，观察样液被染色情况。

方法二：制作花生子叶临时切片，用显微镜观察子叶细胞的着色情况。

取一粒浸泡 2~3 h 的花生种子，去种皮，用单面刀片在花生的横断面上切下薄片，并将切下的薄片放入盛有清水的培养皿中。选取最薄的切片放在载玻片上，滴上苏丹Ⅳ染液，1 min 后用吸水纸吸去染液。滴加几滴 50% 的乙醇溶液，去浮色，然后用吸水纸吸去乙醇。再滴一滴蒸馏水，盖上盖玻片，制成临时装片。在低倍显微镜下找到花生子叶切片的最薄处，换高倍镜观察。

方法三：以花生为例，取一粒浸泡过花生种子，去种皮，用盖玻片在花生种子上刮一下，然后涂在载玻片上，这样花生的一些细胞就被刮下来并涂于载玻片上了。染色方法同上，观察时，要在低倍显微镜下找到被染色的细胞，然后换高倍镜观察。

4. 蛋白质的检测和观察

(1) 选择实验材料，将需要研磨的材料进行研磨，然后向试管内注入 2 mL 研磨好的组织样液。

(2) 向试管内加入 0.1 g/mL 的氢氧化钠溶液 1 mL，摇匀。

(3) 向试管中滴入 0.01 g/mL 的硫酸铜溶液 4 滴，摇匀。

(4) 观察试管中的颜色变化，比较不同材料呈现的颜色变化是否相同，并进行记录。

§ 实验结果分析

1. 还原糖的鉴定

在还原糖的鉴定实验中，含有还原糖的样液中加入费林试剂，在 65 ℃ 水浴中放置 2 min 后，试管中的沉淀由浅蓝色变为棕色，最后呈现砖红色（图 1-1A）。

2. 淀粉的鉴定

实验结果表明，含有淀粉的样液遇碘变蓝（图 1-1B）。但有的样品并不是纯的蓝色，

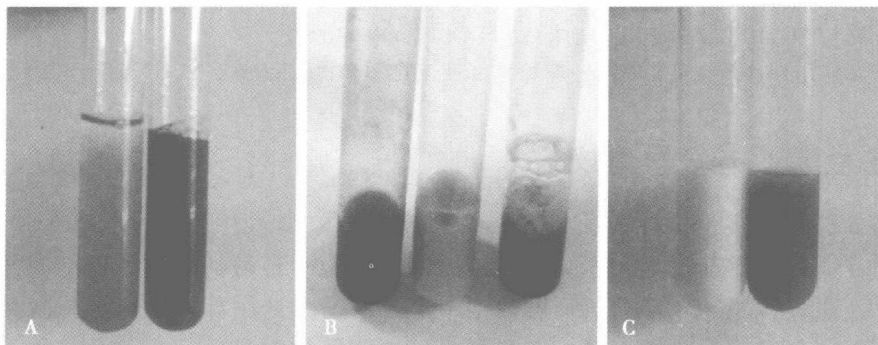


图 1-1 生物组织中还原糖、淀粉和蛋白质鉴定（另见彩插）

A. 还原糖鉴定，左：未加生物组织样液的费林试剂，右：苹果匀浆液与费林试剂。

B. 淀粉鉴定，左：市售淀粉溶液加碘液，中：豆浆加碘液，右：土豆匀浆加碘液。

C. 蛋白质鉴定，左：豆浆，右：豆浆加双缩脲试剂。

而是掺有红色的成分,这可能是由于样液中既含直链淀粉又含支链淀粉的缘故。无论出现什么颜色的样液,在酒精灯上加热时,随着温度的升高,颜色逐渐变淡,最后呈现白色;当温度降低时,又重新出现颜色,这是由于在加热过程中淀粉的螺旋结构被破坏的缘故。

3. 蛋白质的鉴定

实验结果表明,在含有蛋白质的样液中加入双缩脲试剂后,样液呈现紫色(图1-1C),表明样液中的蛋白质与双缩脲试剂发生了反应。

4. 脂肪的鉴定

实验结果表明,苏丹Ⅳ染液遇脂肪后呈现红色。对预设的3种方法可以进行比较(图1-2)。方法一得到的结果是,试管中的样液加入染液后呈现出粉红色。这种方法比较宏观,操作步骤简单,但是看不到脂肪颗粒在细胞中的形态,也不能确定溶液的颜色是否为苏丹Ⅳ染液与花生匀浆混合显出的颜色(图1-2A)。将样本滴在载玻片上制成临时装片,于显微镜下观察,结果是被染色的脂肪颗粒很少(图1-2B),可能是匀浆时破坏了细胞和脂肪结构,导致染色少。方法二的实验结果是,在显微镜下可以观察到细胞内的脂肪颗粒被染成了红色,这种方法观察到细胞内的微观结构,借助显微镜对细胞内脂肪的形态有所了解(图1-2C)。方法三同方法二一样可以观察到脂肪颗粒,但操作步骤简单,缺点是看不到细胞,无法了解脂肪颗粒在细胞中的分布情况(图1-2D)。

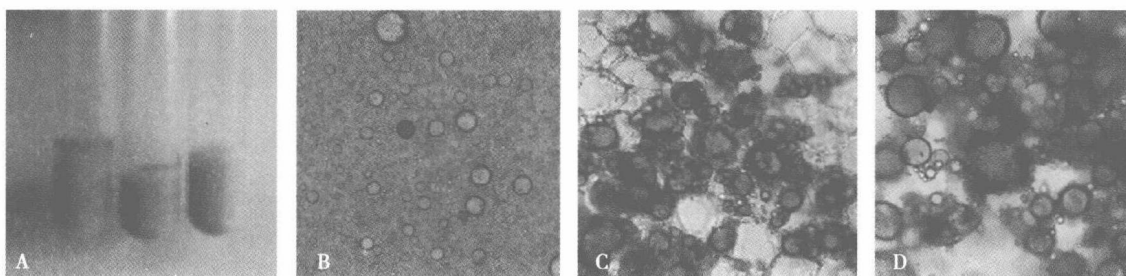


图1-2 脂肪的鉴定(另见彩插)

- A. 匀浆鉴定,左:淀粉液加苏丹Ⅳ染液,中:豆浆加苏丹Ⅳ染液,右:花生匀浆加苏丹Ⅳ染液。
- B. 花生匀浆显微观察,花生匀浆加苏丹Ⅳ染液制备临时装片,20倍物镜下观察。
- C. 花生子叶切片观察,花生子叶切片染色后在20倍物镜下观察。
- D. 花生刮液观察,用盖玻片刮一下花生,染色后在20倍物镜下观察。

§ 注意事项与教学建议

用于鉴定脂肪的实验材料最好选择富含脂肪的种子,如花生种子(取其子叶)。供实验用的花生种子,必须提前浸泡2~3 h。浸泡时间短了,不容易切成片;浸泡时间过长则组织太软,切下的薄片不易成形。教师可根据本地区的情况选用苏丹Ⅲ或苏丹Ⅳ染液。苏丹Ⅲ染液遇脂肪的颜色反应为橘黄色,苏丹Ⅳ染液遇脂肪的颜色反应为红色。因苏丹Ⅳ染液与脂肪的亲合力比较强,所以染色的时间应比较短,一般为1 min左右。

§ 思考题

1. 本实验的实验材料还可以选择哪些?

2. 淀粉分为几大类?
3. 是否任何情况下任何淀粉遇碘都会呈现蓝色?

实验二 观察DNA和RNA在细胞内的分布

§ 背景知识

DNA 和 RNA 是核酸的两大类, 它们在细胞中执行不同的功能, 因而分布也不同。DNA 主要分布在细胞核内, 而 RNA 大部分存在于细胞质中。甲基绿和吡罗红两种染色剂对 DNA 和 RNA 的亲合力不同, 甲基绿使 DNA 呈现绿色, 吡罗红使 RNA 呈现红色。利用甲基绿、吡罗红混合染色剂将细胞染色, 可以显示 DNA 和 RNA 在细胞中的分布。

甲基绿-派洛宁(吡罗红 B) 染色法是由 Pappenhein 和 Unna 提出的, 有近百年的历史了。它是特异性显示细胞内 DNA 和 RNA 的经典方法, 是重要的组织化学染色方法之一, 具有简便、廉价、实用的特点, 在生物学、医学等领域仍广泛应用。

甲基绿-派洛宁染色法在研究肿瘤辨别等方面有广泛的应用。由于肿瘤细胞的核酸代谢以合成代谢增强、分解代谢明显减弱为特点, 可用于对某些肿瘤疾病的诊断。这种染色方法还常应用于淋巴结、脾、骨髓等组织的观察, 以及临床诊断和研究免疫性疾病等。

§ 实验目的

1. 了解 DNA 和 RNA 在细胞内的分布特点和用途。
2. 掌握甲基绿-派洛宁染色方法。

§ 实验原理

DNA 和 RNA 由于结构的差异, 对染料的亲和力也有差异。采用两种特异性染料进行染色, 使 DNA 和 RNA 分别着色, 可以观察到这两种核酸在细胞中的分布。

§ 仪器、材料和试剂

1. 仪器

显微镜, 电子天平, 烧杯, 玻璃棒, 剪刀, 刀片, 滴管, 消毒牙签, 载玻片, 盖玻片, 吸水纸。

2. 材料

人口腔上皮细胞, 洋葱表皮细胞。

3. 试剂

甲基绿, 派洛宁, 无水乙酸, 蒸馏水。

§ 方法与步骤

1. 甲基绿 - 派洛宁染色剂的配制

先配制 A 液和 B 液, 染色前将 A 液与 B 液按 17:8 混合使用 (现用现配, 不宜久放)。

A 液: 5% 的派洛宁水溶液 5 mL, 2% 的甲基绿水溶液 14 mL, 蒸馏水 16 mL。

B 液: 0.2 mol/L 的乙酸缓冲液 16 mL。

2. 口腔上皮细胞的制片

(1) 用消毒牙签在自己的口腔内侧壁上轻轻地刮几下。

(2) 均匀涂抹在洁净的载玻片上。

(3) 滴上甲基绿 - 派洛宁染色剂 1 滴, 染色 5 min, 盖上盖玻片观察。

3. 洋葱表皮细胞的制片

(1) 用镊子轻轻撕取洋葱表皮, 平铺于载玻片上。

(2) 将甲基绿 - 派洛宁染色剂滴在洋葱表皮上, 染色 4 ~ 5 min, 盖上盖玻片观察 (图 2-1A)。也可以先用 0.1 mol/L 的盐酸处理 2 min, 然后再染色 2 min (图 2-1B)。

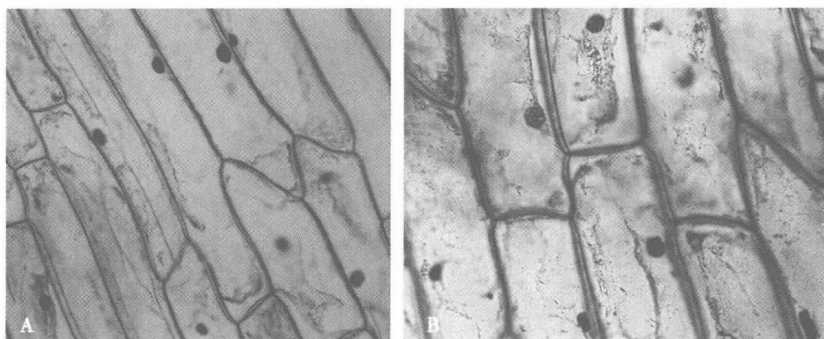


图 2-1 洋葱表皮细胞核酸的染色观察 (另见彩插)

A. 表皮染色 5 min, 细胞核染成绿色, 细胞质染成粉色。

B. 经过 0.1 mol/L 的盐酸处理 2 min, 染色 2 min, 细胞核染成绿色, 细胞质粉色。

§ 实验结果分析

无论以口腔上皮细胞为实验材料, 还是以洋葱表皮为实验材料, 细胞核都被染成绿色, 细胞质都染成明显的粉色。

为什么甲基绿与染色质中 DNA 选择性结合显示绿色? 派洛宁与核仁、细胞质中的 RNA 选择性结合显示粉色? 其原因可能是两种染料在混合染液中有竞争作用, 两种核酸分子都是多聚体, 而其聚合程度有所不同。甲基绿易与聚合程度高的 DNA 结合呈现绿色, 而派洛宁则与聚合程度较低的 RNA 结合呈现粉色 (可能解聚的 DNA 也能与派洛宁结合呈现粉色)。RNA 对派洛宁亲和力大, 被染成粉色, 而 DNA 对甲基绿亲和力大, 被染成绿色。

§ 注意事项与教学建议

1. 取口腔上皮细胞之前先漱口, 以保证细胞纯净。
2. 使用洋葱做材料时, 不要用紫皮洋葱。

§ 思考题

1. 了解 DNA、RNA 在细胞中的分布有什么意义？
2. 显示 DNA、RNA 在细胞中的分布还有哪些方法？

实验三 细胞膜的制备方法

§ 背景知识

细胞膜又称为细胞质膜，是围绕在细胞最外层，由脂质和蛋白质组成的脂质双层膜。它不仅是细胞之间的分隔物质，使细胞具有一个相对稳定的内环境，同时在细胞与环境之间进行物质运输、能量交换和信息传递的过程中起着决定性的作用。

细胞膜与细胞的许多功能关系密切，如细胞之间的信息交流、物质运输、能量传递、兴奋传导、吸收和分泌作用等都与膜有关。细胞的许多重要化学反应都是在生物膜内或者膜表面进行，细胞内巨大的膜面积为酶提供了大量的附着位点，为各种化学反应的顺利进行创造了有利条件。

研究膜的结构和功能具有重要的理论意义和应用价值。目前研究较多的是红细胞膜，哺乳动物的成熟红细胞无核、无细胞器，有利于提取高纯度的细胞膜。通常通过低渗方法使细胞涨破，细胞中的物质流出细胞，再通过离心分离出比较纯净的细胞膜，称为血影。

§ 实验目的

1. 掌握细胞膜的结构特点。
2. 学习细胞膜的分离方法和技术。

§ 实验原理

细胞膜对水具有通透性，细胞在低于细胞内浓度的溶液中会吸水涨破。如果在清水溶液中，细胞会迅速吸水涨破。涨破细胞内的物质流出以后，就是制备的细胞膜。

§ 仪器、材料和试剂

1. 仪器

光学显微镜，微分干涉差显微镜，吸管，载玻片，盖玻片，吸水纸，耳针，镊子，乙醇棉球，移液器（200 μL ），枪头（200 μL ），离心管（1.5 mL）。

2. 材料

人的静脉血。

3. 试剂

- （1）70% 乙醇 70 mL 无水乙醇与 30 mL 蒸馏水混合。

- (2) 生理盐水 取 9 g NaCl 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。
- (3) 柠檬酸钠溶液 6 g 柠檬酸钠溶于 100 mL 生理盐水中。

§ 方法与步骤

1. 用酒精棉擦拭取血部位，进行消毒。选择采血点捏紧皮肤，用消毒的采血针在采血点轻扎一针，挤出少许血液（一滴），将血液滴入 1.5 mL 离心管中，并加入 20 倍体积的柠檬酸钠溶液（即 20 滴柠檬酸钠溶液），既可稀释血液，又可防止血液凝固。
2. 取一滴稀释过的血液，置于载玻片上，盖上盖玻片制成临时装片。置于显微镜下观察，先用低倍镜观察，找到细胞层面后换高倍镜观察并拍照。
3. 在盖玻片的一侧滴一滴蒸馏水，在另一侧用吸水纸慢慢吸水（不要把细胞吸跑），同时调节显微镜的焦距，时刻保持细胞在焦平面上，观察并拍照。
4. 观察胀破细胞，也可以取一小滴稀释过的血液置于载玻片上，加一大滴蒸馏水，然后盖上盖玻片制成临时装片，置于显微镜下观察并拍照。
- 本实验方法仅限于对细胞膜的观察。如果要分离出纯净的细胞膜，要将血液放入离心管中，待细胞胀破以后用离心方法收集细胞膜。

§ 实验结果分析

实验结果如图 3-1 所示。图 A~C 为普通光学显微镜下观察的结果，A 为人的正常红细胞形态，呈圆饼状，中间凹陷；B 为吸水涨圆的红细胞，呈圆球状；C 中的部分红细胞已经涨破，边缘不清晰。图 D~F 为微分干涉差显微镜下观察的结果，D 为人的正常红细胞三维立体图像，圆饼状中间凹陷的特点更加明显；E 为吸水涨圆的红细胞，呈球形；F 为涨破的红细胞，细胞内容物已经释放，细胞呈圆形，几乎没有厚度，图左下角的未涨破的圆球形细胞与已涨破的细胞形成明显对比，而且可以观察到部分涨破细胞的细胞膜外翻，表现为小突起（图的左上和右下角）。通过这两种显微镜的观察，可以得到较为清晰的血细胞涨破后“血影”的形态，用微分干涉差显微镜观察到的图像更好，具有三维立体的效果。

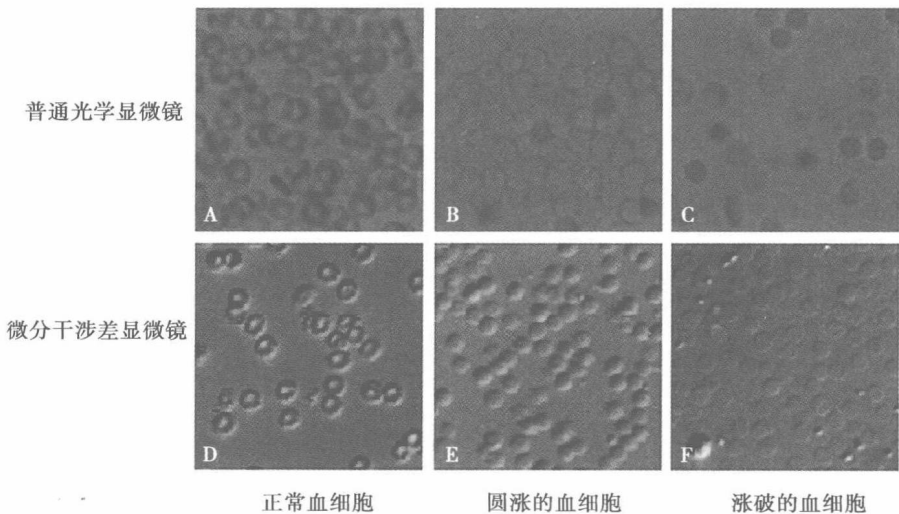


图 3-1 普通光学显微镜及微分干涉差显微镜下观察到的人红细胞 (400 ×)

(另见彩插)

§ 注意事项与教学建议

1. 采血时注意消毒，防止感染。
2. 细胞稀释液浓度不宜过高，避免细胞密度太大，影响观察。
3. 中学课本中的实验步骤是将制备好的血液临时装片，置于显微镜下边加水稀释边吸水，同时观察。笔者认为这样做很难观察到预期结果，因为：①一边加水一边吸水，血细胞会运动，无法调节焦距，很难拍摄到清晰的照片；②红细胞涨破过程较短，在血细胞吸水涨破过程中很难找到细胞层面。笔者的经验是，可将血细胞先加蒸馏水稀释后立即制成装片，然后置显微镜下观察，这样容易找到细胞层面。

§ 思考题

1. 细胞膜的分离技术在生物学和医学研究领域有什么重要意义？
2. 为什么新鲜的血液用于实验效果更明显？
3. 什么叫血影？

实验四 细胞的荧光标记与融合检测细胞膜的流动性

§ 背景知识

膜的流动性是细胞膜结构的基本特征之一，同时也是细胞膜行使其正常功能的必要条件。膜的流动性是指膜结构分子的运动性，它包括膜脂的运动和膜蛋白的运动。多年以来，人们凭借不断创新的实验技术，对膜结构特性的研究取得很大的进展。通过经典的荧光抗体免疫标记法，可以验证细胞膜的流动性：用鼠细胞膜蛋白的荧光抗体（显绿色荧光）和人细胞膜蛋白的荧光抗体（显红色荧光）分别标记小鼠和人的细胞表面蛋白，然后用灭活的仙台病毒处理，使两种细胞融合。10 min 后不同颜色的荧光在融合细胞表面开始扩散，40 min 后已分辨不出融合细胞表面的绿色或红色荧光区域。如用不同的激发光激发，则观察到红色荧光或绿色荧光都均匀地分布在融合细胞表面。这一实验清楚地显示了与抗体结合的膜蛋白在质膜上的运动。

在某些细胞中，当荧光标记时间继续延长，均匀分布在细胞表面的标记荧光就会重新排布，聚集在细胞表面的某些部位，这就是成斑现象；或聚集在细胞的一端，这是成帽现象。这两种现象进一步显示了膜蛋白的流动性。

§ 实验目的

1. 初步了解膜蛋白的荧光标记方法。