



全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材配套用书

细胞生物学实验

— 供中医学、中西医临床医学、中药学、药学等专业用 —

主 编 赵宗江（北京中医药大学）

全国百佳图书出版单位

中国中医药出版社

全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材
全国高等中医药院校规划教材（第十版）
配套用书

细胞生物学实验

（供中医学、中西医临床医学、中药学、药学等专业用）

主 编 赵宗江（北京中医药大学）
副主编 吴勃岩（黑龙江中医药大学）
许 勇（成都中医药大学）
王 淳（辽宁中医药大学）

中国中医药出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验 / 赵宗江主编. —北京: 中国中医药出版社, 2017.1
全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材配套用书
ISBN 978-7-5132-3474-0

I. ①细… II. ①赵… III. ①细胞生物学—实验—中医药院校—
教材 IV. ①Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 136216 号

中国中医药出版社出版

北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层

邮政编码 100013

传真 010 64405750

北京市泰锐印刷有限责任公司印刷

各地新华书店经销

开本 787×1092 1/16 印张 6 字数 124 千字

2017 年 1 月第 1 版 2017 年 1 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978-7-5132-3474-0

定价 27.00 元

网址 www.cptcm.com

如有印装质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线 010 64405720

购书热线 010 64065415 010 64065413

微信服务号 zgzyycbs

书店网址 csln.net/qksd/

官方微博 <http://e.weibo.com/cptcm>

淘宝天猫网址 <http://zgzyycbs.tmall.com>

全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材
全国高等中医药院校规划教材（第十版）
配套用书

《细胞生物学实验》编委会

- 主 编 赵宗江（北京中医药大学）
副主编 吴勃岩（黑龙江中医药大学）
许 勇（成都中医药大学）
王 淳（辽宁中医药大学）
编 委 （以姓氏笔画为序）
王志宏（长春中医药大学）
史海龙（陕西中医药大学）
孙 媛（大连医科大学）
孙继贤（广州中医药大学）
李亚东（北京中医药大学）
杨向竹（北京中医药大学）
杨美娟（北京中医药大学）
汪 涛（天津中医药大学）
宋 强（山西中医学院）
张 帆（甘肃中医药大学）
张 凯（安徽中医药大学）
张小莉（河南中医药大学）
张国红（河北中医学院）
赵丕文（北京中医药大学）
胡秀华（北京中医药大学）
顾 海（南京中医药大学）
徐云丹（湖北中医药大学）
徐昌君（贵阳中医学院）
高碧珍（福建中医药大学）
郭 纯（湖南中医药大学）
黄佩蓓（江西中医药大学）
黄春芳（北京中医药大学）
韩 峻（云南中医学院）
窦晓兵（浙江中医药大学）

编写说明

本实验教材是为全国中医药行业高等教育“十三五”规划教材——《细胞生物学》教学编写的配套教材，适用于中医学、中西医临床医学、中药学、药学等专业教学之用。

细胞生物学实验课的教学目的，是通过基本技能训练以及观察分析实验结果，使学生了解并掌握有关的实验技术原理及实验操作方法，进而培养学生动手实践、观察分析与解决问题的能力。为此，每章节实验内容自成体系，以加强学生的基本技能训练，以及观察分析和科学思维能力的培养。各章节实验均在教师指导下由学生自己动手取材、实验，使学生能对细胞获得形象和生动的认识。

本实验教材的编写分工如下：实验一由许勇、孙继贤修编；实验二由许勇、张凯修编；实验三由张小莉、韩峻修编；实验四由宋强、赵丕文修编；实验五由黄佩蓓、胡秀华、孙媛修编；实验六由王淳、顾海修编；实验七由王淳、史海龙修编；实验八由王志宏、高碧珍、胡秀华修编；实验九由赵丕文、李亚东修编；实验十由高碧珍、徐云丹修编；实验十一由徐云丹、李亚东、赵宗江修编；实验十二由赵宗江、胡秀华修编；实验十三由赵宗江、王志宏、胡秀华修编；实验十四由赵宗江、王淳、黄春芳修编；实验十五由杨美娟、吴勃岩修编；实验十六由杨向竹、许勇修编；实验十七由吴勃岩、杨向竹修编；实验十八由吴勃岩、杨向竹修编；实验十九由赵丕文、黄春芳修编；实验二十由赵宗江修编；实验二十一由汪涛、郭纯修编；实验二十二由窦晓兵、赵宗江修编；实验二十三由徐云丹、赵宗江修编；实验二十四由张帆、徐昌君、张国红修编。

本实验教材选编了一些细胞生物学的基本实验，如细胞的显微测量、细胞活力测定、细胞计数、细胞组分分级分离、细胞组分的化学反应、细胞生

理活动、细胞染色体技术、细胞培养、细胞融合、免疫荧光技术、电镜技术等，为医学课题研究打下坚实的基础。本实验教材内容共 24 个实验，五年制、七年制和研究生教学根据实际情况选择具体实验。

赵宗江
于北京中医药大学
2016 年 11 月

目 录

实验一 动物细胞的基本形态观察和显微测量.....	1	实验十四 细胞的原代和传代培养.....	52
实验二 线粒体的活体染色及电镜照片观察	5	实验十五 酸性磷酸酶的显示方法.....	55
实验三 液泡系的活体染色及电镜照片观察.....	8	实验十六 电镜生物标本的制备及镜下观察	57
实验四 细胞骨架——微丝的染色及观察.....	11	实验十七 肿瘤细胞的软琼脂集落培养和测定	62
实验五 细胞器的光镜切片和电镜照片观察.....	13	实验十八 培养细胞生物膜系统的光镜和电镜标本制备与观察	65
实验六 细胞生理活动的观察.....	17	实验十九 免疫荧光抗体法检查细胞表面抗原	67
实验七 细胞组分的化学反应.....	23	实验二十 姊妹染色单体互换 (SCE) 标本制备与分析	69
实验八 细胞核与线粒体的分级分离...	26	实验二十一 银染核仁形成区的光镜和电镜标本制备及观察 ...	71
实验九 细胞分裂的形态观察.....	28	实验二十二 染色体扫描电镜标本制备及观察	74
实验十 正常细胞与肿瘤细胞染色体标本制备与观察	32	实验二十三 细胞转染外源基因.....	76
实验十一 细胞融合.....	36	实验二十四 小鼠骨髓细胞染色体标本的制备与观察	79
实验十二 提前凝集染色体标本的制备与观察	41		
实验十三 培养细胞的形态观察和细胞计数	47		

实验一 动物细胞的基本形态观察和显微测量

一、实验目的

掌握在光学显微镜下细胞的基本结构；学习临时制片的操作方法；学会使用显微测微尺测量细胞。

二、实验用品

1. 材料和标本

活蟾蜍 1 只、人血涂片 1 张、蟾蜍脊髓横切片 1 张、家兔骨骼肌纵切片 1 张。

2. 器材和仪器

光学显微镜 1 台、目镜测微尺一个、镜台测微尺 1 个、载玻片 5 张、盖玻片 2 张、手术器材 1 套、解剖盘 1 个、小平皿 1 个、吸管 1 只、擦镜纸、吸水纸、牙签。

3. 试剂

1% 甲苯胺蓝、Ringer's 液（两栖类用）。

三、实验内容

（一）细胞的基本形态观察

1. 原理

细胞的形态结构与功能相关是很多细胞的共同特点，在分化程度较高的细胞中更为明显。这是生物漫长进化过程的产物，从进化观点看有一定的合理性。例如：具有收缩功能的肌细胞伸展为细长形；具有感受刺激和传导冲动功能的神经细胞有长短不一的树状突起；游离的血细胞则为圆形、椭圆形或圆饼形。不论细胞的形状如何，光学显微镜下细胞的结构一般分为三大部分，即细胞膜、细胞质和细胞核。但也有例外，如哺乳动物成熟的红细胞没有细胞核。

2. 观察方法与结果

（1）人口腔黏膜上皮细胞标本的制备与观察

取清洁牙签，用钝端在自己口腔内腮面轻刮少许黏液，并弃掉。换只牙签，在原位

稍用力刮取上皮细胞，均匀地涂在一张干净的载玻片中央（不可反复涂抹），滴 1 滴甲苯胺蓝染液，染色 5min，盖上盖片，吸去多余染液。先在低倍镜下观察，可见视野中有许多单个或成堆的被染成蓝色的细胞，即人口腔黏膜上皮细胞。细胞呈多边形或椭圆形，细胞中央有一染成深蓝色的细胞核，核周围均质部分为细胞质，细胞外表有细胞膜（图 1-1）。

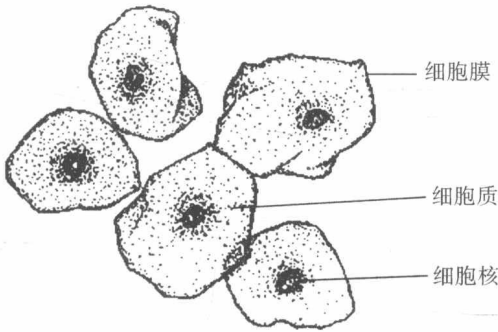


图 1-1 人口腔黏膜上皮细胞（引自高文和，2001）

(2) 蟾蜍血涂片的制备与观察

取一滴蟾蜍血液，靠近一端滴在载玻片上，将另一载片的一端呈 45°角紧贴在血滴的前缘，均匀用力向前推，使血液在载片上形成均匀的薄层（图 1-2），晾干。将制备好的蟾蜍血涂片在低倍镜下选择涂布均匀的血细胞，换高倍镜观察。蟾蜍的红细胞呈椭圆形，有核，细胞膜不显著。白细胞数目少，为圆形。此外，还能看到各种形态不同的血小板（图 1-3）。

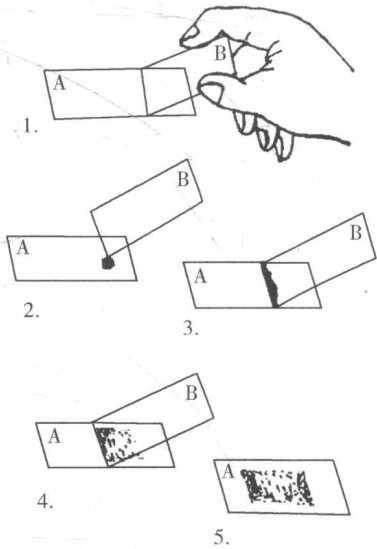


图 1-2 血涂片操作过程（引自高文和，2001）

(3) 人血细胞的观察

取人血涂片 1 张，在显微镜下观察，可见人红细胞为凹圆盘形，无核。白细胞数目少，为圆形。

(4) 制备蟾蜍脊髓压片观察脊髓前角运动神经细胞

取一只蟾蜍，左手握住其股部，腹部贴着掌心，食指压住蟾蜍头部前端使其尽量屈腹。在头和躯干之间可摸到一凹陷处（枕骨大孔），用解剖针从枕骨大孔向内刺入 1 ~ 2mm 深（注意不要太深），随即即将针尖向前搅碎脑组织，然后再转向后深入椎孔内，搅碎脊髓，待看到蟾蜍后肢强直肌肉松弛时为止。在口裂处剪去头部，除去延脑，剪开椎管，可见乳白色脊髓，取下脊髓放在平皿内，用 Ringer's 液洗去血液后放在载片上，剪碎。将另一载片压在脊髓碎块上，用力挤压。将上面的载片取下即可得到压片。在压片上滴一滴甲苯胺蓝染液，染色 10min，盖上盖片，吸去多余染液。在显微镜下观察，染色较深的小细胞是神经胶质细胞。染成蓝紫色的、大的、有多个突起的

细胞是脊髓前角运动神经细胞，胞体呈三角形或星形，中央有一个圆形细胞核，内有一个核仁（图 1-4）。

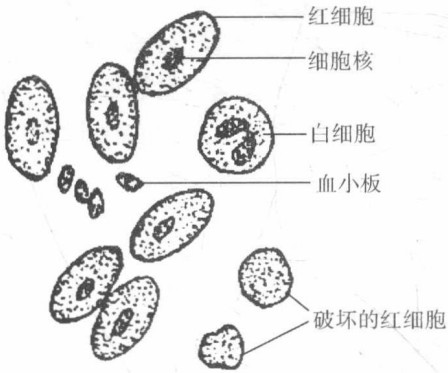


图 1-3 蟾蜍血的各类细胞
(引自高文和, 2001)

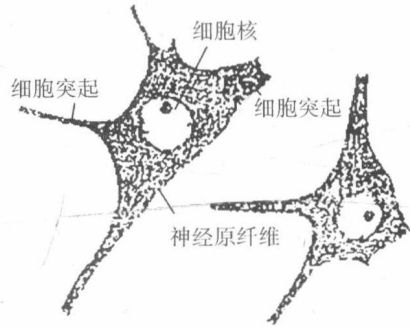


图 1-4 蟾蜍脊髓神经细胞
(引自高文和, 2001)

(5) 骨骼肌细胞的观察

取家兔骨骼肌纵切片，置于低倍镜下观察，可见细胞呈圆柱形，其内有許多细胞核（图 1-5）。

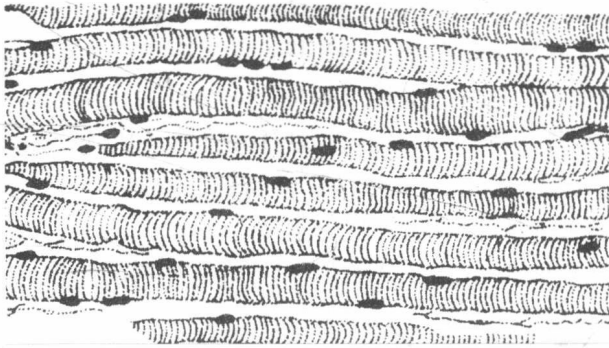


图 1-5 家兔骨骼肌纵切片 (引自梁素华, 2011)

(二) 显微测微尺的使用

1. 原理

显微测微尺由目镜测微尺和镜台测微尺组成，两尺配合使用。目镜测微尺，简称目微尺，是一块圆形的玻璃片，直径 20 ~ 21mm。它的上面刻有直线或网格的标尺。其中网格的目微尺可用来测量物体的体积。使用目微尺时，先将目镜从镜筒中抽出，旋去接目透镜，然后将目微尺放在目镜的光阑上。注意让有刻度的一面朝下，再将接目透镜旋上，把目镜插入镜筒，即可进行测量。

镜台测微尺，简称台微尺，是一块特制的载玻片。它的中央封着一把刻度标尺，全长 1mm，共划分成 10 个大格，每一个大格又分成 10 个小格，共 100 个小格，每一小

格长 0.01mm，即 10μm。在标尺的外围有一小黑环，利于找到标尺的位置。

要测量标本的长度，首先必须对目微尺在不同放大倍数的物镜下进行标定。

2. 方法

(1) 将台微尺夹于载物台上，调焦直至看到台微尺刻度。这时目微尺和台微尺同时显示在视野中，转动目镜，使目微尺标尺直线与台微尺标尺直线尽量靠近平行，最终促使两线重合，再移动台微尺，使两个微尺左边一端平齐，然后从左到右找出两个微尺另一次重合的直线（图 1-6），分别计数重合线之间台微尺和目微尺各自包含的格数，根据公式即可计算出目微尺每个小格的标度。

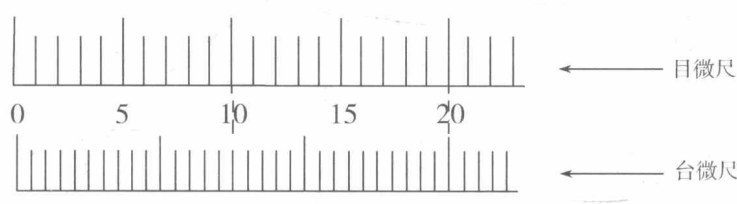


图 1-6 显微测微尺标定示意图（引自高文和，2001）

(2) 按下式求出目镜测微尺每格代表的长度

$$\text{目微尺每个小格标示的长度} (\mu\text{m}) = \frac{\text{台微尺格数}}{\text{目微尺格数}} \times 10$$

这样，就可进行测定。测定时，取下台微尺，换上标本，记录被检标本占目微尺的格数，然后乘以每小格代表的长度，即为标本的实际长度。如果更换不同放大率的镜头，必须重新标定目微尺，这样才能再次测量。

根据测量结果可计算各种细胞、细胞核的体积及核质比例，公式如下：

- 1) 椭圆形：计算式为 $V = 4/3 \pi ab^2$ (a 、 b 为长、短半径)。
- 2) 圆球形：计算式为 $V = 4/3 \pi R^3$ (R 为半径)。
- 3) 核质比例：计算式为 $N_p = V_n / (V_c - V_n)$ (V_c 为细胞的体积， V_n 为细胞核的体积)。

(三) 测量人口腔黏膜上皮细胞

从显微镜载物台上取下镜台测微尺，换上人口腔黏膜上皮细胞标本，测量细胞、细胞核的长短径。

实验二 线粒体的活体染色及电镜照片

观察

一、实验目的

掌握一种活体染色方法，了解光学显微镜和电子显微镜下线粒体基本形态与结构。

二、实验用品

1. 材料和标本

家兔 1 只、兔肝细胞光镜切片（詹纳斯绿 B 染色）、线粒体的电镜照片。

2. 器材和仪器

普通光学显微镜、手术器材一套、解剖盘、小平皿、载玻片、盖玻片、吸水纸、10mL 注射器、吸管、牙签。

3. 试剂

1/300 詹纳斯绿 B 染液、Ringer's 液（哺乳类用）。

三、实验内容

（一）线粒体的活体染色

1. 原理

线粒体是真核细胞内一种重要的细胞器，是细胞进行呼吸作用的场所。细胞各项活动所需要的能量，主要通过线粒体呼吸作用来提供。活体染色是应用无毒或毒性较小的染色剂真实地显示活细胞内某些结构而又很少影响细胞生命活动的一种染色方法。詹纳斯绿 B（Janus green B）是线粒体的专一性活体染色剂，具有脂溶性，能跨过细胞膜。解离后，有染色能力的基团带正电，结合在带负电的线粒体内膜上。内膜的细胞色素氧化酶使染料保持氧化状态，呈现蓝绿色，而在周围的胞质内染料被还原成无色。

线粒体浸没在染液中能维持活性数小时，使我们能够直接看到生活状态线粒体的外形、分布及运动。

2. 方法与结果

（1）家兔肝细胞线粒体的活体染色

用空气栓塞法处死家兔，置于解剖盘内，迅速打开腹腔，取兔肝边缘较薄的肝组织

一小块 ($2 \sim 3\text{mm}^3$), 放入盛有 Ringer's 液的平皿内洗去血液 (用镊子轻压), 用吸管吸去 Ringer's 液, 在平皿内加 1/300 詹纳斯绿 B 染液, 让组织块上表面露在染液外面, 使细胞内线粒体的酶系可进行充分的氧化, 这样才有利于保持染料的氧化状态, 使线粒体着色。当组织块边缘染成蓝色时即可, 一般需要染 30min。

染色后, 将组织块移到载玻片上, 用镊子将组织块拉碎, 就会有一些细胞或细胞群从组织块脱离。将稍大的组织块去掉, 使游离的细胞或细胞群留在载玻片上, 加 1 滴 Ringer's 液, 盖上盖玻片, 吸去多余水分。显微镜观察, 肝细胞质中许多线粒体被染成蓝绿色, 呈颗粒状 (图 2-1)。

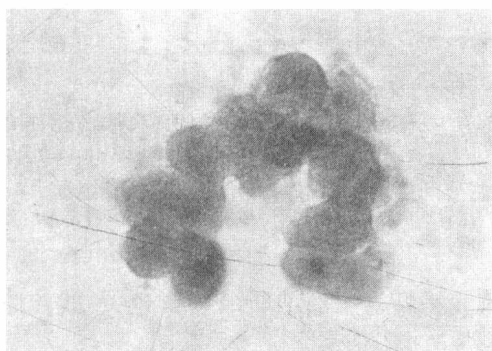


图 2-1 家兔肝细胞中的线粒体
(引自章静波, 2011)

(2) 人口腔黏膜上皮细胞线粒体的活体染色

用牙签刮取口腔黏膜上皮细胞涂于清洁的载玻片上, 滴加詹纳斯绿 B 染液, 在室温下染色 15min, 覆以盖玻片, 盖玻片下两侧可放头发丝支撑, 使不压迫细胞并蓄纳较多染液, 如果观察时间较长, 可适当添注染液。

用 $40\times$ 物镜观察即可见到蓝绿色的线粒体, 细胞质接近无色。注意该染液有轻微毒性, 若染色过久, 线粒体可能发生溃变, 出现空泡。

(二) 线粒体的光镜切片观察

用詹纳斯绿 B 染色的兔肝细胞光镜切片, 肝细胞中的线粒体呈蓝绿色的颗粒。

(三) 线粒体的电镜照片观察

不同细胞中线粒体的形态和数目不同。线粒体的外形多样, 如圆形、椭圆形、哑铃形和杆状。线粒体的数目与细胞类型和细胞的生理状态有关, 线粒体多聚集在细胞生理功能旺盛的区域。

线粒体嵴的数目与分布方式是多种多样的。一般与线粒体长轴垂直排列, 但也可见到与线粒体长轴平行排列的脊。脊的横切面呈囊状或管状。嵴的数量与细胞呼吸功能的强度有很大关系。以下一组照片是电镜下观察到的线粒体 (图 2-2)。

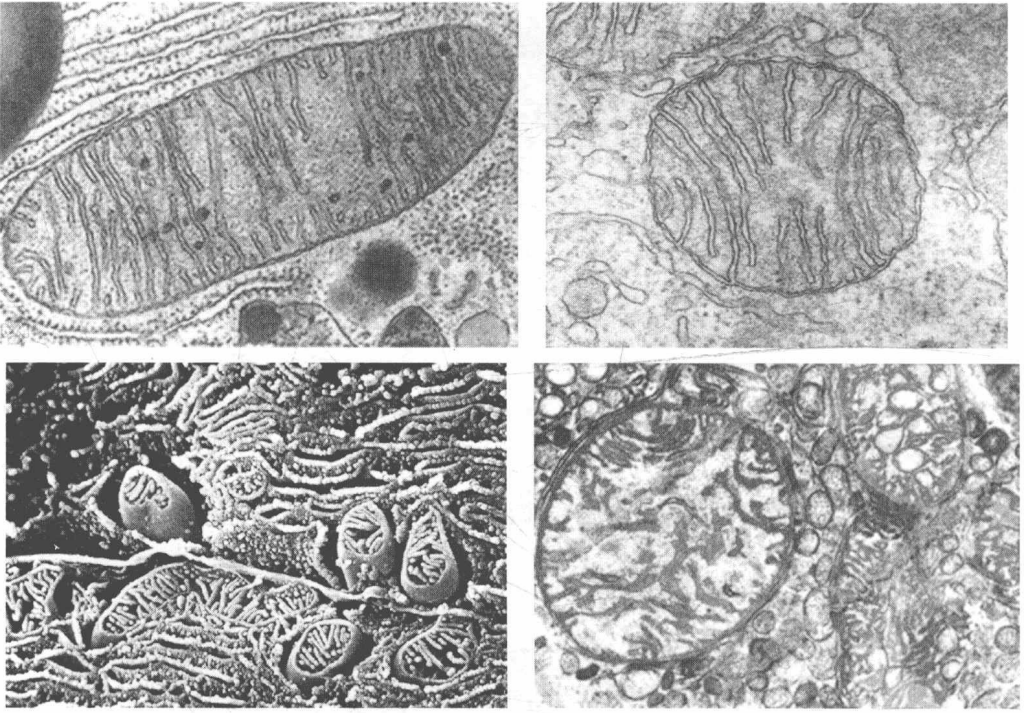


图 2-2 电镜下的线粒体

实验三 液泡系的活体染色及电镜照片

观察

一、实验目的

掌握一种活体染色方法，了解光学显微镜和电子显微镜下液泡系的基本形态结构。

二、实验用品

1. 材料和标本

蟾蜍 1 只、软骨细胞电镜照片。

2. 器材和仪器

光学显微镜 1 台、手术器材 1 套、解剖盘 1 个、载玻片、盖玻片、吸水纸。

3. 试剂

1/3000 中性红染液、Ringer's 液（两栖类用）。

三、实验内容

（一）蟾蜍胸骨剑突软骨细胞液泡系活体染色及观察

1. 原理

在动物细胞内，凡是由单层膜包裹的小泡都属于液泡系，包括内质网、高尔基复合体、溶酶体、过氧化物酶体、转运泡、吞噬泡等。软骨细胞内含有较多的粗面内质网和发达的高尔基复合体，能合成与分泌软骨黏蛋白及胶原纤维等，因而液泡系发达。中性红是液泡系的专一性活体染色剂，在细胞处于生活状态时，只将液泡系染成红色，细胞质和细胞核不被染色，中性红染色可能与液泡系中的蛋白质有关。

2. 方法

取 1 只蟾蜍，破坏脑和脊髓，剪开胸腔，取胸骨剑突软骨最薄部分的一小片，置于载玻片上，滴加 1/3000 中性红染液，染色 10 ~ 15min，用吸水纸吸去染液，加 1 滴 Ringer's 液，盖上盖玻片，吸去多余 Ringer's 液，镜下观察。

3. 结果

显微镜下观察，可见软骨细胞为椭圆形，细胞核周围有许多染成玫瑰红色、大小不一的小泡，即为软骨细胞液泡系（图 3-1）。

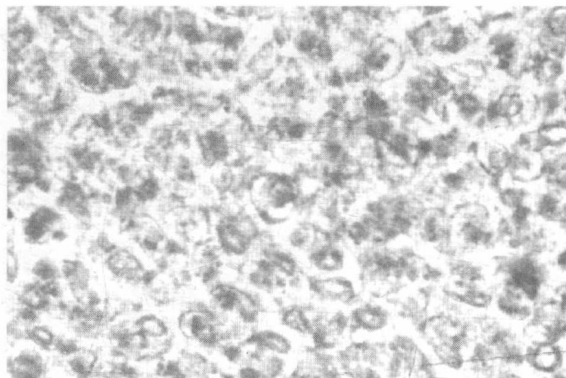


图 3-1 蟾蜍胸骨剑突软骨细胞中液泡系的显示（引自章静波，2011）

（二）大白鼠胫骺软骨细胞电镜照片的观察

动物细胞液泡很小，即使是活体染色也只能看出是一个小点，为了进一步看清液泡的结构，我们有必要观察软骨细胞的电镜照片。

大白鼠胫骺骨细胞电镜照片，细胞核与核仁很清楚，细胞质中有丰富的粗面内质网，液泡系发达，液泡由单层膜包围，细胞周边有液泡释放（图 3-2，图 3-3，图 3-4，图 3-5）。

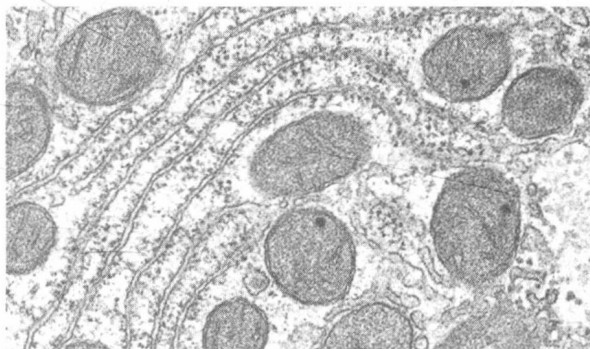


图 3-2 电镜下的粗面内质网

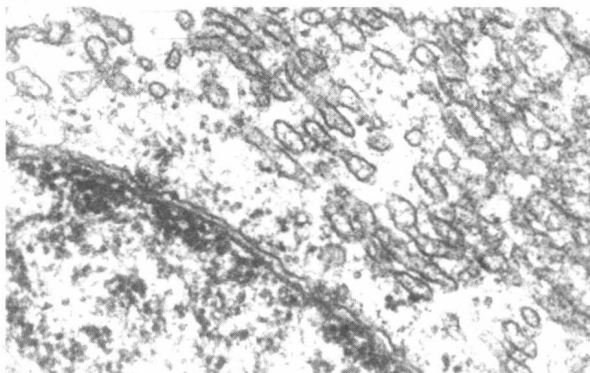


图 3-3 电镜下的滑面内质网

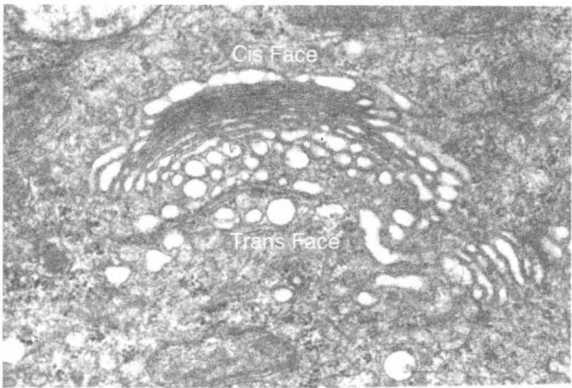


图 3-4 电镜下的高尔基复合体

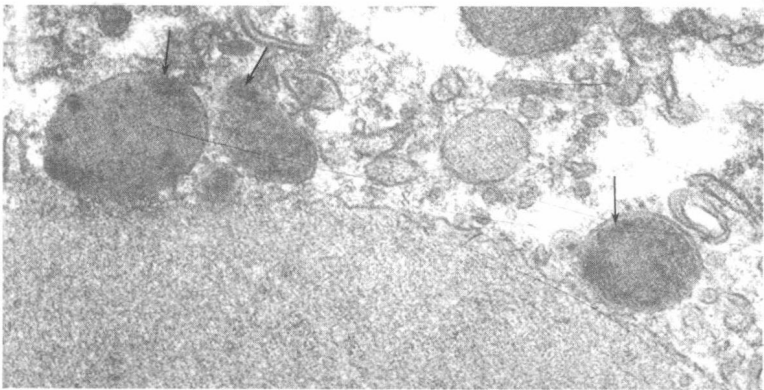


图 3-5 电镜下的溶酶体