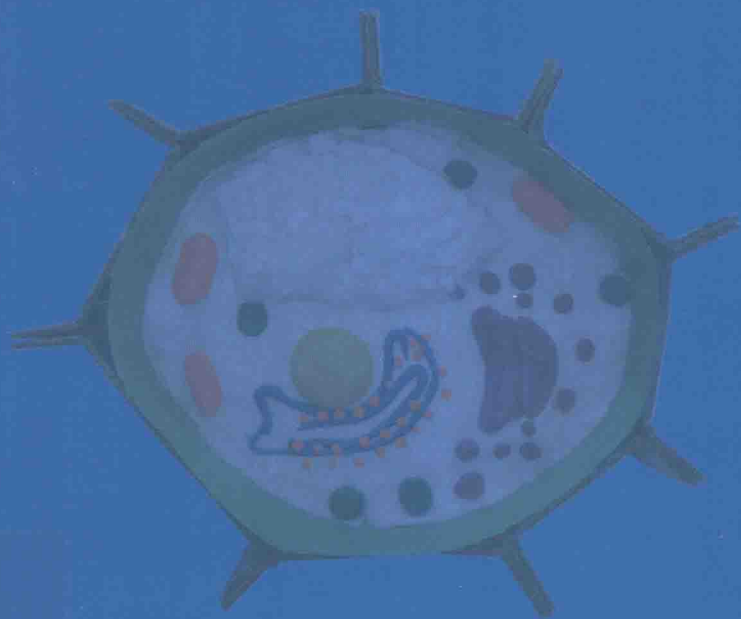


细胞生物学实验 简明教程 与习题指南

主编 王任翔



科学出版社

细胞生物学实验简明教程 与习题指南

主编 王任翔

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书分两篇：第一篇为细胞生物学实验教程，包括基础性、综合性实验，研究性、设计性实验两部分，共 28 个实验。所选实验均为细胞生物学实验基本的、经典的技术和方法，内容包括细胞形态结构的显微和亚显微结构观察，细胞器分离与观察技术，细胞生理生化技术，细胞分裂、染色体制片与核型分析技术，细胞培养和细胞工程技术，细胞凋亡的诱导和细胞凋亡的流式细胞仪检测等。第二篇为细胞生物学习题指南，目的是帮助学生理解、消化和巩固课堂内容。

本书可作为高等院校生物类专业本科细胞生物学实验课程的教材，特别适合师范院校生命科学、生物技术专业或相关专业的学生使用，也可供相关科研及实验技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验简明教程与习题指南/王任翔主编. —北京: 科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-048755-1

I. ①细… II. ①王… III. ①细胞生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 131783 号

责任编辑: 王玉时 / 责任校对: 郑金红
责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 迷底书装

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>

北京科印技术咨询服务公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

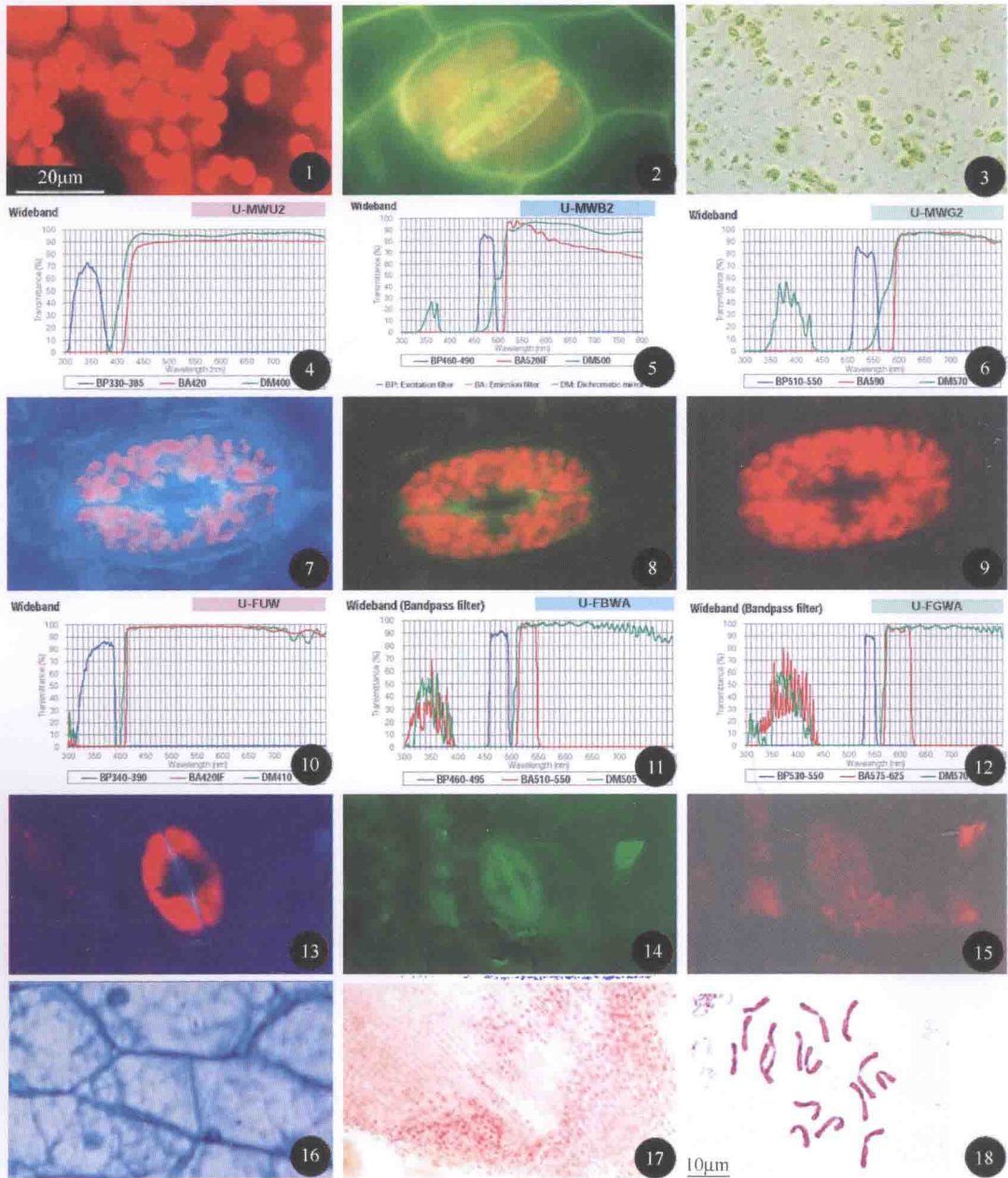
2016 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016 年 10 月第二次印刷 印张: 10 3/4

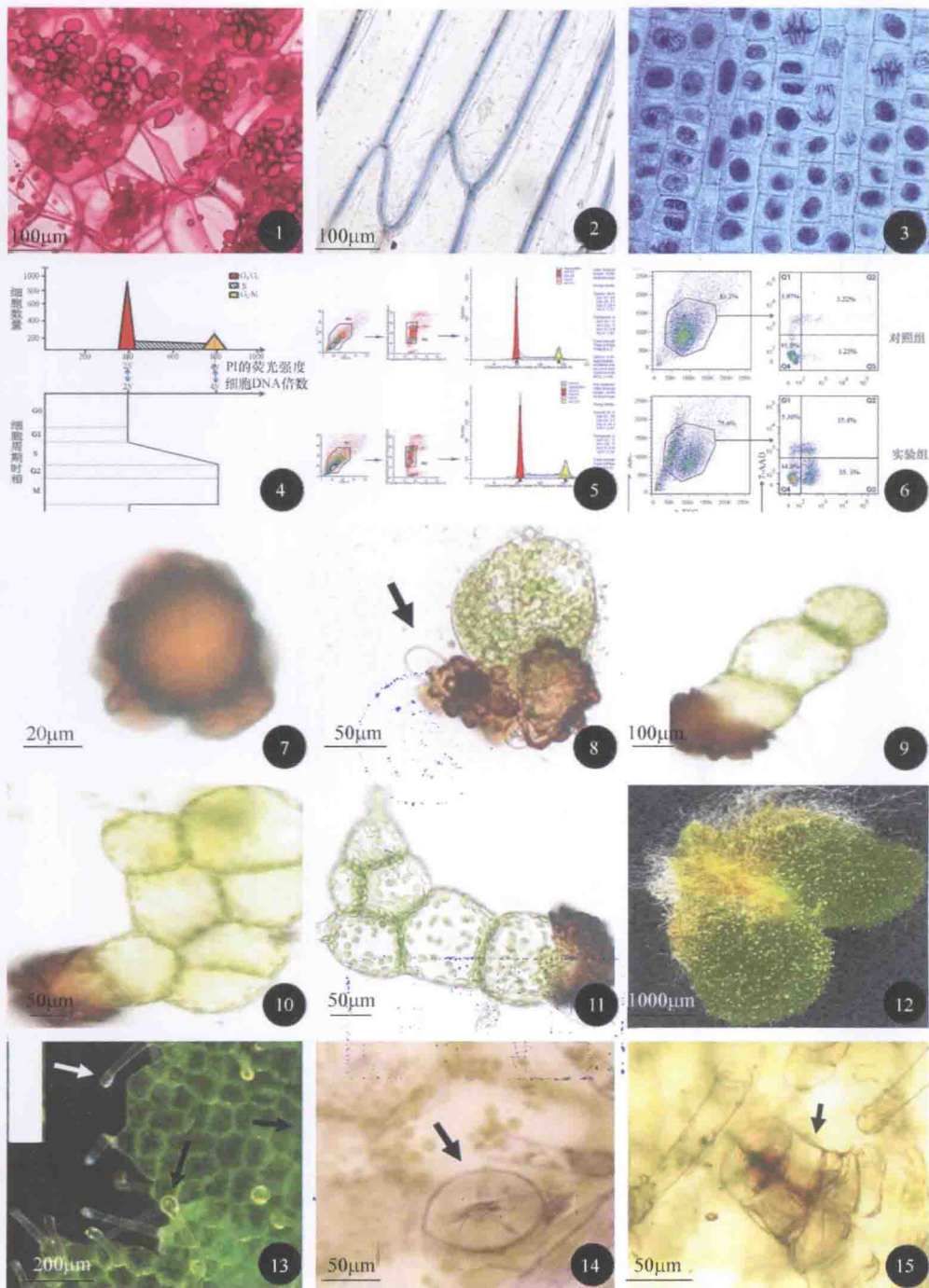
字数: 255 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)



图版 I 1. 叶绿体的自发荧光; 2. 叶绿体的二次荧光; 3. 离体叶绿体; 4~6. OLYMPUS BX2 系列三种荧光激发块 U-MWU2、U-MWB2、U-MWG2 光谱图; 7~9. OLYMPUS BX2 系列三种荧光激发块观察到的叶表皮气孔叶绿体自发荧光; 10~12. OLYMPUS BX3 系列三种荧光激发块 U-FUW、U-FBWA、U-FGWA 光谱图; 13~15. OLYMPUS BX3 系列三种荧光激发块观察到的叶表皮气孔叶绿体自发荧光; 16. 洋葱鳞茎内表皮细胞骨架(微丝); 17. 根尖细胞液泡系; 18. 洋葱根尖细胞染色体 ($2n=16$)



图版 II 1. 马铃薯多糖定位; 2. 洋葱内表皮过氧化物酶细胞定位; 3. 洋葱根尖有丝分裂; 4. 细胞周期检测中 PI 荧光的强度与细胞内 DNA 含量的关系; 5. 顺铂对 A549 细胞周期分布的影响; 6. 顺铂对 A549 细胞凋亡的诱导; 7. 孢子; 8. 孢子萌发开裂 (箭头示假根); 9. 丝状体; 10. 片状体; 11. 片状体 (示细胞中的叶绿体); 12. 原叶体; 13. 毛状体 (箭头示); 14. 精子器 (箭头示); 15. 颈卵器 (箭头示)

编写人员名单

主 编 王任翔

副主编 刘华英 王小敏 何英姿

覃 玥 方利娟

编 委（按姓氏汉语拼音排序）

陈志坚（广西师范大学）

方利娟（百色学院）

何英姿（广西师范学院）

刘华英（广西师范大学）

罗奉奉（河池学院）

蒲仕明（广西师范大学）

覃 玥（河池学院）

王任翔（广西师范大学）

王小敏（玉林师范学院）

张 慧（玉林师范学院）

前 言

细胞生物学从细胞的发现之日起就与实验仪器的发明和实验技术的更新密切联系，从光学显微镜、电子显微镜对细胞结构和功能的研究，到用现代分子生物学技术对细胞生命活动规律和机制的研究，再到 20 世纪末多莉羊克隆及胚胎干细胞研究等技术突破性的进展，使 21 世纪上半叶成为细胞科学的世纪。在我国生命科学高等教育教学中，细胞生物学被指定为主干专业课程之一，细胞生物学实验则是本课程的重要组成部分。

为适应高等师范院校人才培养模式和教育的需要，我们组织多所高等师范院校教学一线的骨干教师，在多年教学改革和实验教学的基础上，编写了本教材。编写本教材的目的主要是通过基本实验方法、技能的训练，培养学生独立分析问题、解决问题和科学思维的能力。本教材分两篇：第一篇为细胞生物学实验简明教程，包括基础性、综合性实验，以及研究性、设计性实验两部分，共 28 个实验。所选实验涵盖目前细胞生物学研究领域经常用到的经典实验方法和实验技术，内容包括细胞形态结构的显微和亚显微观察技术、细胞器分离与观察技术、细胞生理生化技术、细胞分裂和染色体制片与核型分析技术、细胞培养和细胞工程技术，新增了不少与现代细胞生物学相关的技术，如胚胎干细胞的分离与培养技术、细胞凋亡的诱导和流式细胞仪检测技术等。此外还提供了 4 个研究、设计性实验供学生参考选做，由学生自行组合、选题、查文献资料、设计实验方案，独立完成实验，独立撰写研究论文，使学生得到科学研究的初步训练，为毕业论文及将来的科学研究工作打下基础。为避免相关学科实验重复，基因组 DNA 的提取、基因的克隆、生物信息学的方法和技术等交叉学科实验内容均未编入。第二篇为细胞生物学习题指南，以王金发主编的《细胞生物学》（第 1 版，科学出版社，2003）、翟中和等主编的《细胞生物学》（第 3 版，高等教育出版社，2007）和杨维才等主编的《郑国锷细胞生物学》（第 1 版，科学出版社，2015）为蓝本，精选各章节习题并对其进行简要解答；特点是把枯燥无味的习题同相关的诺贝尔奖结合起来，引导学生了解相关知识背后科学家求真创新的感人故事，以达到启发学生的创新意识和灵感、帮助学生理解巩固课堂知识的目的。

本教材中每个实验的编写力求做到：内容丰富全面，原理简明扼要，操作具体简单；每个实验都附有实验结果参考图。因此，本教材具有简明、实用的特点。

本教材可作为高等院校生物类专业本科基础细胞生物学实验课程的教材，特别适合师范院校生物科学、生物技术专业或相关专业的学生使用，大多数实验兼顾了动物和植物材料，各高校可根据自身教学资源条件和实验教学时间进行自主选择。本教材也可供相关科研及实验技术人员参考。

本教材的编写人员均为长期在细胞生物学理论和实验教学一线的老师，编写的内容是他们多年教学实践的经验 and 研究成果。编写人员有（按姓氏汉语拼音排序）：陈志坚（广西师范大学）、方利娟（百色学院）、何英姿（广西师范学院）、刘华英（广西师范大学）、罗奉奉（河池学院）、蒲仕明（广西师范大学）、覃玥（河池学院）、王任翔（广西师范大学）、王小敏（玉林师范学院）、张慧（玉林师范学院）；广西师范大学生命科学学院硕士研究生林婷婷和庞洁参与了习题精选、部分实验的验证和文字编辑排版工作，统稿和审稿由王任翔老师完成。

在本教材的编写及出版过程中，科学出版社给予了大力的支持与帮助，在此表示衷心的感谢！最后，我们还要特别感谢广西师范大学生命科学学院武正军教授对本教材的大力支持，同时非常感谢广西师范大学“2014年广西优势特色专业建设——生物技术专业”项目的资助！

由于水平有限，疏漏和欠妥之处在所难免，敬请批评指正。

编 者

2016年4月

目 录

第一篇 细胞生物学实验简明教程

第一部分 基础性、综合性实验	3
实验一 普通光学显微镜的原理、结构及使用方法 ——染色体、核仁组织区、染色体带型标本的观察	3
实验二 显微制片的基本方法与技术	9
I. 临时制片法	9
II. 永久制片法	11
实验三 荧光显微镜的原理、结构及使用方法	14
实验四 相差显微镜的原理、结构及使用方法	19
实验五 数码显微摄影技术	22
实验六 流式细胞仪的原理、结构及使用方法	26
实验七 电子显微镜的原理、结构及演示	30
实验八 细胞大小和数目的测量及计算	32
实验九 细胞器的分离、纯化和鉴定	36
I. 叶绿体的分离与荧光观察	36
II. 差速离心法分离线粒体	38
实验十 细胞骨架观察	40
I. 细胞的胞质环流	40
II. 细胞骨架的显示和光学显微镜观察	42
实验十一 细胞膜的渗透性	44
实验十二 植物凝集素对红细胞的凝集作用	45
实验十三 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬实验	48
实验十四 DNA 的细胞化学——Feulgen 反应	50
实验十五 细胞中多糖和过氧化物酶的定位观察	52
实验十六 线粒体和液泡系的超活染色与观察	54
实验十七 细胞核仁组织区的银染色法	57
实验十八 细胞的有丝分裂与减数分裂观察	59
I. 细胞有丝分裂观察	59
II. 细胞减数分裂观察	60
实验十九 植物染色体标本的临时制备与观察	63

实验二十 蛙类骨髓细胞染色体标本制备	66
实验二十一 动物细胞染色体核型分析	68
实验二十二 动物细胞原代培养技术	70
实验二十三 动物胚胎干细胞的分离与培养技术	72
实验二十四 烟草叶肉原生质体的分离、融合与培养	76
第二部分 研究性、设计性实验	79
实验二十五 细胞周期时相及药物阻断的流式细胞仪检测	79
实验二十六 细胞凋亡的诱导和流式细胞仪检测	81
实验二十七 细胞微核检测技术	83
实验二十八 孢子萌发、细胞分裂、生长分化及配子体发育的细胞学研究	86

第二篇 细胞生物学习题指南

第一部分 习题精选	91
第一章 绪论	91
第二章 细胞的统一性和多样性	92
第三章 细胞生物学研究方法	94
第四章 细胞质膜	96
第五章 物质的跨膜运输	97
第六章 细胞的能量转换——线粒体和叶绿体	98
第七章 真核细胞内膜系统、蛋白质分选与膜泡运输	101
第八章 细胞信号转导	104
第九章 细胞骨架	106
第十章 细胞核与染色体	107
第十一章 核糖体	109
第十二章 细胞增殖及其调控	111
第十三章 程序性细胞死亡与细胞衰老	113
第十四章 细胞分化与癌细胞	114
第十五章 细胞社会的联系：细胞连接、细胞黏着和细胞外基质	116
第二部分 参考答案	119
第一章 绪论	119
第二章 细胞的统一性和多样性	121
第三章 细胞生物学研究方法	123
第四章 细胞质膜	125
第五章 物质的跨膜运输	127
第六章 细胞的能量转换——线粒体和叶绿体	130
第七章 真核细胞内膜系统、蛋白质分选与膜泡运输	133
第八章 细胞信号转导	138
第九章 细胞骨架	143

第十章 细胞核与染色体	144
第十一章 核糖体	148
第十二章 细胞增殖及其调控	149
第十三章 程序性细胞死亡与细胞衰老	153
第十四章 细胞分化与癌细胞	156
第十五章 细胞社会的联系：细胞连接、细胞黏着和细胞外基质	158
参考文献	160
附录一 实验室规则	161
附录二 细胞生物学实验绘图方法与要求	161

第一篇

细胞生物学实验简明教程

第一部分

基础性、综合性实验

实验一 普通光学显微镜的原理、结构及使用方法

——染色体、核仁组织区、染色体带型标本的观察

【实验目的】

- (1) 了解普通光学显微镜的原理、结构。
- (2) 掌握普通光学显微镜的使用方法。
- (3) 了解染色体、核仁组织区、染色体带型标本制备的原理。
- (4) 掌握人类染色体、核仁组织区、染色体带型的特征。

【实验原理】

显微镜的主要部分是目镜和物镜，为两组凸透镜。物镜的焦距短，目镜的焦距较长，其成像原理如图 1-1 所示。当被观察物体 AB 放在物镜前方的 1~2 倍焦距之间时，光线通过物镜在镜筒中形成一个放大的倒立实像 A'B'，这个实像恰好位于目镜的焦平面之内，通过目镜后形成一个放大的倒立虚像 A''B''。用调焦装置使 A''B'' 落在人眼睛的明视距离 (25mm) 内，眼睛看到的物体才最清晰。从图 1-1 可以看出，A''B'' 的视角比眼睛直接看 AB 的视角大得多，因此用显微镜可以看清非常微小的物体。

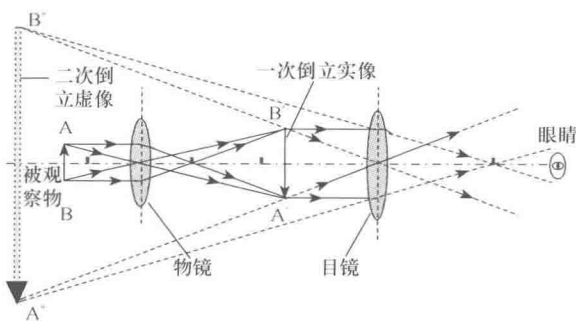


图 1-1 普通光学显微镜成像原理图

向培养物中加入适量秋水仙素可使纺锤体微管解聚，导致细胞停留在中期，从而获得大量的分裂细胞。用低渗盐溶液（一般是 0.075mol/L 的 KCl）处理，使其中的红细胞及分裂象细胞膜和一部分细胞质除去，最后以气干法制片，可获得较好的染色体标本。

核仁组织区 (NOR) 是染色体上编码 5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 的基因 (rDNA) 所在的部位。染色体上具有转录活性或已转录过 rRNA 基因的部位伴有丰富的

酸性蛋白 (C₂₃ 蛋白, 分子质量 100kDa; B₂₃ 蛋白, 分子质量 37kDa), 这类酸性蛋白含有 SH 基团和二硫键, 可将 AgNO₃ 中的 Ag⁺ 还原成黑色的 Ag 颗粒, 故有转录活性的核仁组织区可被 AgNO₃ 镀上颗粒而呈黑色, 无转录活性的核仁组织区则不被着色。银染色强度与 rRNA 的转录活性有关。

近代染色体显带技术始于 Caspersson 及其同事, 以及 Pardue 和 Gall 的开拓性研究, 前者运用荧光素芥子啉因 (QM) 使染色体的不同区段出现亮暗相间的带纹, 后者在原位杂交中使染色体的着丝粒区域染上深色。随后相继出现了 Q、G、C、R、N、T、Cd 等多种类型的显带技术, 显示染色体的许多亚结构, 最常用的一种是 G-显带技术。

G-带的形成与 Giemsa 染料组成的染色特性是分不开的。Giemsa 染料由不同噻嗪染料混合物 (最重要的是天青) 和伊红组成, 而染色体的着色有赖于在原位形成噻嗪-伊红 (2:1) 沉淀物。着色过程: 首先, 两个噻嗪分子与 DNA 结合, 然后再与一个伊红分子结合; 其次, 需要一个疏水环境, 以利于染料沉淀物的累积。染色体上含有高浓度疏水性蛋白质的区域, 有利于噻嗪-伊红沉淀物的形成。这些区域相当于含高比例二硫键的氧化态蛋白质区域, 经过一系列处理后显示暗带; 而另一些区域 (明带区) 则为含巯基的还原态蛋白质区域, 为亲水性蛋白质, 对染料的亲和力低, 不易显色。这表明在 G-带的形成过程中, 蛋白质状态是一个很关键的因素, 这与染色体的功能有关。如果染色体上某一区域的 DNA 为重复序列, 则其转录活性就低, 相应地包装它们的蛋白质也就较稳定, 可能通过较强的二硫键形成很稳定的疏水的 α 螺旋结构, 成为染料沉淀物沉积的环境, 从而显示出阳性带; 相反如果染色体上某一区域的 DNA 富含具有转录活性的结构基因, 则其在功能上就相对活跃, 包装它们的蛋白质也就较疏松, 在构象上类似于 β 折叠结构, 经处理后, 二硫键断裂, 还原为巯基, 成为亲水性蛋白质而不利于染料沉淀物的积累, 所以着色浅, 显示阴性带。

G-带有许多优点: 染色是永久性的, 标本保存时间长, 带纹通常较稳定, 有利于染色体的结构分析, 以及物种之间染色体同源性的比较。

【实验用品】

器具: 显微镜、电子天平、冰箱、超声波清洗机、载玻片、盖玻片、尖头镊子、刀片、标记笔、量筒、吸管、橡皮头、吸水纸、擦镜纸、细口瓶、广口瓶、烧杯、玻璃棒、容量瓶、洗瓶、滴瓶。

材料: 染色体、核仁组织区、染色体带型标本。

【实验方法和步骤】

一、普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜的构造主要分为三部分: 机械部分、照明部分和光学部分 (图 1-2)。

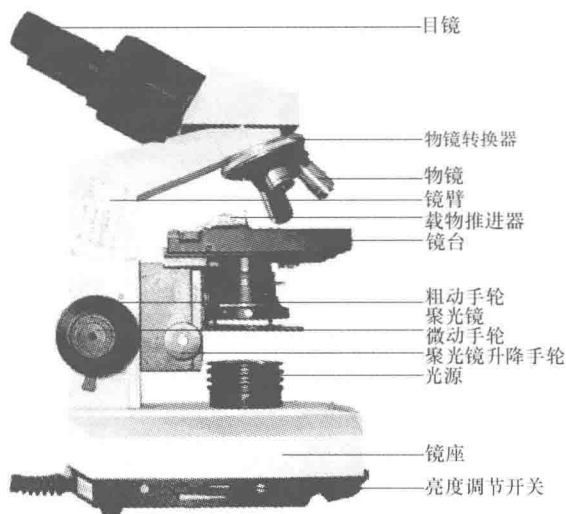


图 1-2 普通光学显微镜的构造

1. 机械部分

(1) 镜座：是指显微镜的底座，用以支持整个镜体。

(2) 镜柱：是指镜座上面直立的部分，用以连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂：一端连于镜柱，一端连于镜筒，支持镜筒与镜台，是取放显微镜时手握的部位。

(4) 镜筒：连在镜臂的前上方，镜筒上端装有目镜，下端装有物镜转换器，保护成像的光路和亮度。

(5) 物镜转换器：接于镜筒下方的圆盘状部件，可自由转动，盘上有 3 个或 4 个圆孔，是安装物镜的部位。转动转换器，可以调换不同倍数的物镜，当听到碰叩声后方可进行观察，此时物镜光轴恰好对准通光孔中心，光路接通。

(6) 镜台（载物台）：在镜筒下方，有方形、圆形两种，用以放置玻片标本，中央有一通光孔，镜台上装有玻片标本推进器（推片器），推进器左侧有弹簧夹，用以夹持玻片标本，镜台下有推进器调节轮，可使玻片标本作左右、前后方向的移动。

(7) 调节器：是指装在镜柱上的大小两种螺旋，调节时使镜台作上、下方向的移动，用以调节焦距。①粗调节器（大螺旋）：大螺旋称为粗调节器，移动时可使镜台作快速和较大幅度的升降，迅速调节物镜和标本之间的距离使物像呈现于视野中，通常在使用低倍镜时，先用粗调节器迅速找到物像。②细调节器（小螺旋）：小螺旋称为细调节器，移动时可使镜台缓慢地升降，多在运用高倍镜时使用，从而得到更清晰的物像，并借以观察标本不同层次和不同深度的结构。

2. 照明部分

装在镜台下方，包括反光镜、集光器。

(1) 反光镜：装在镜座上面，可向任意方向转动，有平、凹两面，其作用是将光源光线反射到聚光器上，再经通光孔照明标本。凹面镜聚光作用强，适于光线较弱时使用；平面镜聚光作用弱，适于光线较强时使用。

(2) 集光器（聚光器）：位于镜台下方的集光器架上，由聚光镜和光圈组成，其作用是把光线集中到所要观察的标本上。①聚光镜：由一片或数片透镜组成，起汇聚光线的作用，加强对标本的照明，并使光线射入物镜内，升降聚光器可以调节视野中光亮度的强弱。②光圈（虹彩光圈）：在聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，其外侧伸出一柄，推动它可调节其开孔的大小，以调节通过的光量。

3. 光学部分

(1) 目镜：装在镜筒的上端，通常备有2个或3个目镜，上面刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $15\times$ 符号，表示其放大倍数，一般装的是 $10\times$ 的目镜。

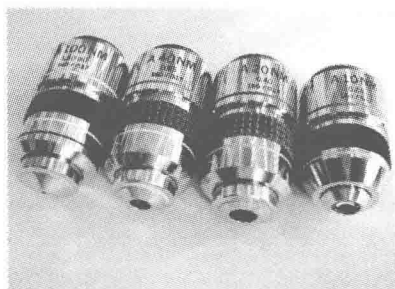


图 1-3 不同倍数物镜

(2) 物镜：装在镜筒下端的物镜转换器上，一般有3个或4个物镜，其中刻有“ $10\times$ ”符号的为低倍镜，刻有“ $40\times$ ”符号的为高倍镜，刻有“ $100\times$ ”符号的为油镜。通常在物镜上标有主要的性能指标：放大倍数和镜口率，如 $10/0.25$ 、 $40/0.65$ 和 $100/1.30$ ；镜筒长度和所要求的盖玻片厚度，如 $160/0.17\text{mm}$ （图 1-3）。

镜口率（numerical aperture, N.A.）反映该镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨率越高。

各物镜的镜口率如表 1-1 所示。

表 1-1 不同倍数物镜的比较

物镜	镜口率 (N.A.)	工作距离/mm
$10\times$	0.25	5.40
$40\times$	0.65	0.39
$100\times$	1.30	0.11

表 1-1 中的工作距离是指显微镜处于工作状态（物像调节清楚）时物镜的下表面与盖玻片上表面之间的距离，物镜的放大倍数越大，它的工作距离越小。

显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数与目镜的放大倍数的乘积。例如，物镜为 $10\times$ ，目镜为 $10\times$ ，其放大倍数就为 $10\times 10=100$ 。

二、普通光学显微镜的使用方法

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置：显微镜平时存放在柜或箱中，用时从柜中取出，右手紧握镜臂，左手托住镜座，将显微镜放在自己左肩前方的实验台上，镜座后端距桌边 $3\sim 6\text{cm}$ 为