



同济大学本科教材出版基金资助

生命科学基础实验

Basic Experiments of Life Science

主 编 吕立夏 李 姣

Chief editor Lyu Lixia Li Jiao



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS



同济大学本科教材出版基金资助项目

生命科学基础实验

Basic Experiments of Life Science

主 编 吕立夏 李 姣

Chief editor Lyu Lixia Li Jiao



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

本书贯彻科研应用于教学实践与教学实践联系临床应用的宗旨,注重学生理论联系实际和操作能力的培养,循序渐进指导学生学习和细胞学、生物化学和遗传学的实验技术。本书适用于医学专业的学生和留学生,也可供学习医学专业英语的学生使用。

Introduction

This Chinese-English edition of experimental textbook will link lab practice with scientific research and clinical application and provide readers with a modern and basic experience in experimental biochemistry, cell biology and genetics. The textbook can be appropriate in experimental teaching of Chinese, English and both Chinese and English.

图书在版编目(CIP)数据

生命科学基础实验=Basic experiments of life science:汉文、英文 / 吕立夏,李姣主编. —上海:同济大学出版社,2018.8

ISBN 978-7-5608-7843-0

I. ①生… II. ①吕…②李… III. ①生命科学—实验—教材—汉、英 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 091799 号

生命科学基础实验

Basic Experiments of Life Science

主 编 吕立夏 李 姣

责任编辑 赵 黎 责任校对 徐春莲 封面设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn
(地址: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

排 版 南京月叶图文制作有限公司

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 11.5

字 数 287 000

版 次 2018 年 8 月第 1 版 2018 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-7843-0

定 价 69.00 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 员

主 编 吕立夏 李 姣

副主编 高芙蓉 邵志华

参 编 史秀娟 田海滨 张介平 沙继宏 郭 峰

金彩霞 徐 磊 徐晶莹 张 陈 杨 红

高山峨 王 娟 贾 松 许 洁

Chief editor: Lyu Lixia Li Jiao

Associate editor: Gao Furong Shao Zhihua

Editorial board member:

Shi Xiujuan Tian Haibin Zhang Jieping Sha Jihong

Guo Feng Jin Caixia Xu Lei Xu Jingying

Zhang Chen Yang Hong Gao Shane Wang Juan

Jia Song Xu Jie

前 言

“以学生为中心,以能力培养为导向”,本书秉承“将一流的科研成果转化为优质的教学资源”的教学理念,将培养创新精神与创新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。

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,包括显微镜使用、细胞周期观察、细胞培养和细胞融合等细胞学基本技术,比色、离心、电泳和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。综合性实验项目主要有3项:①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、培养及诱导分化,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,加深干细胞生物学理论的理解;②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;③ACE基因的多态性分析——学生通过无创性收集漱口水中脱落细胞的基因组DNA,进一步通过PCR对ACE基因的多态性进行基因诊断,以帮助学生更好地理解临床疾病易感性的分子机制。

为完成本实验教材,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

2018年2月

目 录

前言

实验 1 光学显微镜的使用及细胞周期	(1)
实验 2 细胞传代培养及细胞融合	(13)
实验 3 骨髓间充质干细胞原代培养与定向分化	(17)
实验 4 人染色体核型分析	(21)
实验 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).....	(26)
实验 5(1) 双缩脲(Biuret)法测定蛋白质含量	(30)
实验 5(2) BCA 法测定蛋白质含量	(32)
实验 5(3) 考马斯亮蓝法(Bradford)测定蛋白质含量	(34)
实验 6 层析法	(37)
实验 6(1) 凝胶层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	(46)
实验 6(2) 离子交换层析分离混合氨基酸	(49)
实验 7 碱性磷酸酶米氏常数的测定	(51)
实验 8 离心法—适应性免疫反应——淋巴细胞分离及鉴定	(55)
实验 8(1) 单个核细胞的分离——密度梯度离心法	(57)
实验 8(2) 淋巴细胞的鉴定——B 淋巴细胞数量检测	(59)
实验 9 电泳法—SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离混合蛋白质	(61)
实验 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	(73)
实验 11 人颊黏膜上皮细胞基因组 DNA 的抽提及 ACE 基因多态性的检测	(79)

Contents

Preface

Experiment 1	Optical Microscope and Cell Cycle	(83)
Experiment 2	Cell Culture and Cell Fusion	(93)
Experiment 3	Primary Culture and Directional Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells	(99)
Experiment 4	Human Karyotype Analysis	(104)
Experiment 5	Spectrophotometry and Determination of Protein Concentration	(110)
	Experiment 5 (1) Biuret Assay	(116)
	Experiment 5 (2) BCA Assay	(119)
	Experiment 5 (3) Bradford Assay	(123)
Experiment 6	Chromatography	(126)
	Experiment 6 (1) Using Gel Filtration Column Chromatography to Separate Hemoglobin and Nucleoprotamine	(133)
	Experiment 6 (2) Separating Amino Acids Mixture by Ion-Exchange Chromatography	(137)
Experiment 7	Determination of Km of Alkaline Phosphatase	(141)
Experiment 8	Centrifugation Technique —Adaptive Immune Response; Isolation and Identification of Lymphocyte	(147)
	Experiment 8 (1) The Separation of Monocytes by Density Gradient Centrifugation	(151)
	Experiment 8 (2) Lymphocyte Identification — Counting the Number of B Lymphocyte	(154)
Experiment 9	Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins	(157)
Experiment 10	Effect of Hormone on Blood Sugar and Lipoprotein of Normal and Diabetic Rat	(165)
Experiment 11	Polymorphism Analysis of ACE Gene by Extracting Genome DNA of Buccal Epithelial Cells	(172)
Reference	(176)

实验 1

光学显微镜的使用及细胞周期

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。

原理

1. 光学显微镜

1.1 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、镜臂和镜座等;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) 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



图 1-1 光学显微镜的结构图



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。

(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。

(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。

(4) 焦距调节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。焦距调节器有两个旋钮,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。

(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。

(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。

(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。

(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镜片胶合而成,很容易因脱胶而报废;其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,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 多棱反射镜

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) 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。

(2) 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,而凹透镜则可以聚集入射光线。

(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力。因而,集光器的质量和使用将直接影响显微成像的质量。集光器一般有三个部件:集光镜、集光镜光阑和集光镜调节器。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,它的焦距越短。焦距越短,物镜的透镜和玻片之间的距离(工作距离)也越短。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十倍。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,当空气为介质时,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

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。

物镜的工作距离为物镜的下表面到盖玻片上表面之间的距离(表1-1)。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。

表 1-1 标准物镜的特性

放大倍率	物镜的数值孔径	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



物镜的分辨力也称分辨率。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 $0.2\ \mu\text{m}$,所以无法分辨如细胞膜($0.01\ \mu\text{m}$ 厚)这样的结构。

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:10~20 倍为低倍物镜,简称低倍镜;20~60 倍为高倍物镜,简称高倍镜;60 倍以上的物镜需要用镜油作光学介质,所以称作油镜。

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:

(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。

(2) 转动旋转盘时,务必将载物台降至最低点,以免因操作不当而刮伤镜头。

(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。

(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) 若长期不使用,应以二甲苯清洁所有镜头。

(6) 镜头要保持清洁。显微镜使用前,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黏有的污物。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。

7. 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),根据观察实事求是地画出图像。
- (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。

8. 显微测量

8.1 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 1-2)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 1-3)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。

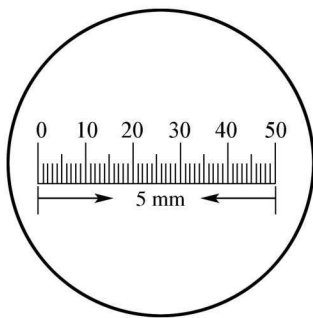


图 1-2 目镜测微尺

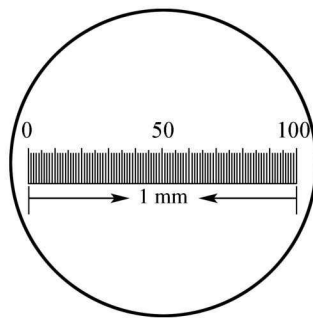


图 1-3 镜台测微尺

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。



8.2 显微测量的基本方法

8.2.1 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 1-4),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。

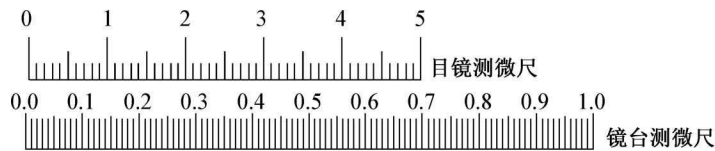


图 1-4 目镜测微尺的标定

$$\text{目镜尺每小格长度} = \text{台微尺每小格长度} \times \frac{\text{目微尺全长对应台微尺的格数}}{\text{目微尺全长的总格数}}$$

例如:10 倍目镜配 10 倍物镜,目镜测微尺共有 50 小格,正好与镜台测微尺 71 小格重叠,已知镜台测微尺每小格为 $10\ \mu\text{m}$,则

$$\text{目镜测微尺上每小格长度} = 10\ \mu\text{m} \times 71/50 = 14.2\ \mu\text{m},$$

用同法分别校正在高倍镜下和油镜下目镜测微尺每小格所代表的长度。

8.2.2 显微测量应遵循的原则

由于不同显微镜及附件的放大倍数不同,因此,校正目镜测微尺必须针对特定的显微镜和附件(特定的物镜和目镜)进行,而且只能在特定的情况下重复使用,当更换不同放大倍数的目镜或物镜时,必须重新校正目镜测微尺每一格所代表的长度。

9. 细胞周期

细胞分裂(cell division)可分为无丝分裂(amitosis)、有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)三种类型。无丝分裂又称为直接分裂,由 R. Remark(1841)首次发现于鸡胚血细胞。表现为细胞核伸长,从中部缢缩,然后细胞质分裂,其间不涉及纺锤体形成及染色体变化,故称为无丝分裂。无丝分裂不仅发现于原核生物,同时也发现于高等动植物,如植物的胚乳细胞、动物的胎膜及间充组织等。有丝分裂,又称为间接分裂,由 W. Fleming(1882)



首次发现于动物及 E. Strasburger(1880)发现于植物。特点是有纺锤体染色体出现,子染色体被平均分配到子细胞,这种分裂方式普遍见于高等动植物。减数分裂是指染色体复制一次而细胞连续分裂两次的分裂方式,是高等动植物配子体形成的分裂方式。

有丝分裂过程是一个连续的过程,为了便于描述,人为地划分为前期、前中期、中期、后期、末期及胞质分裂六个时期,其中间期包括 G_1 期、S 期和 G_2 期,主要进行 DNA 复制等准备工作。

前期的主要事件是:①染色质凝缩;②分裂极确立与纺锤体开始形成;③核仁解体。前期最显著的特征是染色质通过螺旋化和折叠,变短变粗,形成光学显微镜下可以分辨的染色体,每条染色体包含两个染色单体。中期指从染色体排列到赤道面(equatorial plane)上,到姊妹染色单体开始分向两极的一段时间,纵向观动物染色体呈辐射状排列。染色体两边的牵引力就像拔河一样达到平衡。后期指姊妹染色单体分开并移向两极的时期,当子染色体到达两极后,标志这一时期结束。末期是从子染色体到达两极,至形成两个新细胞为止的时期。末期涉及子核的形成和胞质分裂两个方面。末期子核的形成,大体经历了与前期相反的过程,即染色体解聚缩,核仁出现和核膜重新形成。核仁由染色体上的核仁组织中心形成(NORs),几个 NORs 共同组成一个大的核仁,因此,核仁的数目通常比 NORs 的数目要少。前期核膜解体后,核纤层蛋白与核膜残余小泡结合,末期核纤层蛋白去磷酸化,介导核膜的重新装配。

虽然核分裂与胞质分裂(cytokinesis)是相继发生的,但属于两个分离的过程,例如,大多数昆虫的卵,核可进行多次分裂而无胞质分裂,某些藻类的多核细胞可长达数尺,以后胞质才分裂形成单核细胞。

动物细胞的胞质分裂是以形成收缩环的方式完成的,收缩环在后期形成,由大量平行排列的肌动蛋白和结合在上面的 myosin II 等成分组成,用细胞松弛素及肌动蛋白和肌球蛋白抗体处理均能抑制收缩环的形成。不难想象,胞质收缩环工作原理和肌肉收缩时是一样的。

植物胞质分裂的机制不同于动物,后期或末期两极处微管消失,中间微管保留,并数量增加,形成桶状的成膜体(phragmoplast)。来自高尔基体的囊泡沿微管转运到成膜体中间,融合形成细胞板。囊泡内的物质沉积为初生壁和中胶层,囊泡膜形成新的质膜,由于两侧质膜源于共同的囊泡,因而膜间有许多连通的管道,形成胞间连丝。源源不断运送来的囊泡向细胞板融合,使细胞板扩展,形成完整的细胞壁,将子细胞一分为二。

步骤

1. “a”字片及红绿羊毛片的观察

取“a”字装片,先用肉眼直接观察“a”字大小和方位,然后用低倍物镜观察。注意目镜视野中的“a”字与肉眼看到的有什么不同;移动玻片,了解玻片的真实移动方向与视野中的物象的移动方向有什么差异。观察中应充分利用“a”字的不对称性。



2. 不同组织细胞形态特征的观察

2.1 蛙肾小管上皮细胞的观察

先用低倍镜观察切片。肾脏内有许多肾小管,因其在肾内盘折,所以,同一切片中可见到肾小管的许多切面。肾小管是由单层立方上皮围成的细长管道,中间的管腔不被染色。镜下可见细胞核呈球形,染色较深。细胞质中有许多染色较深的颗粒。

2.2 神经细胞的观察

低倍镜下可见脊髓横切片中央呈蝴蝶状,是脊髓的灰质。灰质中有一些星状细胞,即神经细胞。银染法染色的标本中神经细胞被染成褐色。

在高倍镜下可以看到,神经细胞有许多长短不一的突起,细胞核呈球形,有核仁。银染标本中,细胞核不被染色,呈空泡状,核仁被染成褐色。

2.3 平滑肌细胞的观察

为了便于观察,我们所用的标本是经过特殊处理的,平滑肌细胞被分离。搜索分离较好的区域,移至视野中央,换用高倍镜。

平滑肌细胞呈梭形,位于细胞中央的椭圆形细胞核也较长。细长的形状有利于收缩。

3. 人口腔黏膜上皮细胞标本的制作、观察与显微测量

3.1 人口腔黏膜上皮细胞标本的制作

(1) 取一片洁净的载玻片,在载玻片的中央滴一滴台盼蓝染液。

(2) 用消毒牙签的钝端,稍用力地在口腔内面颊黏膜上刮取少许黏膜上皮细胞,轻轻涂抹在染液中,使口腔黏膜上皮细胞均匀地分布于染液中。

(3) 取盖玻片,先让其边接触载玻片的染液,用镊子或解剖针挑起另一端然后轻轻放下,注意不要产生气泡。

(4) 用吸水纸吸去盖玻片边缘多余的染液。

3.2 人口腔黏膜上皮细胞标本的观察

显微镜下观察可见口腔黏膜上皮细胞为扁平椭圆形,中央有椭圆形核,染成蓝色。

4. 植物细胞的有丝分裂

洋葱根尖生长点是一团始终分裂旺盛的细胞,大多处于有丝分裂期,是研究有丝分裂的好材料。生长点细胞呈方形,体积小,细胞质浓,核质比大。正因为有这些特点,所以在同一个切片上细胞往往相互重叠,再加之生长点细胞的分裂方向非常多样,对初学者而言,观察较困难。洋葱根尖伸长区的细胞呈长方形,体积比生长点细胞大,而且有一定比例处

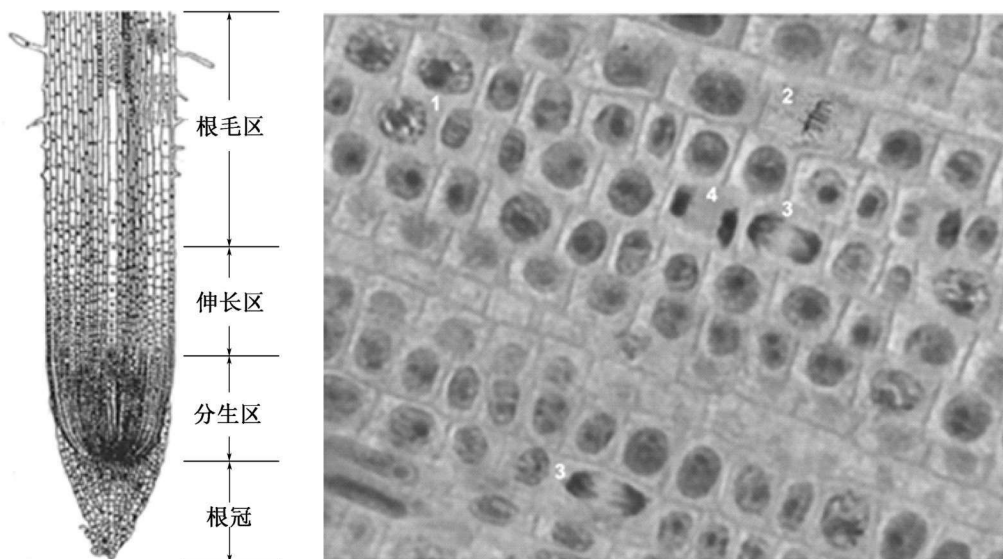


在有丝分裂期,分裂轴基本与根尖的长轴平行,所以较适合观察有丝分裂。

(1) 用低倍镜观察洋葱根尖纵切片(图 1-5)。找到洋葱根尖伸长区。

(2) 观察伸长区,可以粗略地分辨间期细胞和有丝分裂期细胞,注意有丝分裂期细胞之间的不同。

(3) 按照图(图 1-5)的顺序依次观察各个时期的分裂细胞,每次都先用低倍物镜再换用高倍物镜。特别注意有丝分裂各个时期的特点。



洋葱根尖有丝分裂各期:1. 前期 2. 中期 3. 后期 4. 末期

图 1-5 洋葱根尖纵切面(左)和有丝分裂(右)

5. 动物细胞的有丝分裂

动物细胞的有丝分裂与植物细胞的有丝分裂基本一致,所不同的是动物细胞的有丝分裂过程中有中心体的形成和作用。马蛔虫卵子的受精过程始于精子与初级卵母细胞的接触,受精触发了初级卵母细胞的减数分裂。精子的细胞核进入初级卵母细胞后,始终停留在卵母细胞的细胞质中,直到卵母细胞减数分裂完成。初级卵母细胞的减数分裂产生三个极体和一个卵子,卵子中有两个细胞核,一个是精子的细胞核,另一个是卵子的细胞核,它们分别被称为雄原核和雌原核。然后雌雄原核融合成为合子,完成染色体的复倍($2n=4$)。

马蛔虫子宫中有大量发育中的受精卵。本次实验观察的是马蛔虫受精卵的第一次卵裂。对于马蛔虫受精过程的特点,在观察中应予充分注意。

(1) 用低倍镜观察马蛔虫受精卵纵切片。注意辨别受精卵的结构,特别要分清细胞膜和卵膜。

(2) 按照附图(图 1-6)的顺序依次观察各个时期的分裂细胞,每次都先用低倍物镜再换用高倍物镜。特别注意有丝分裂各个时期的特点。