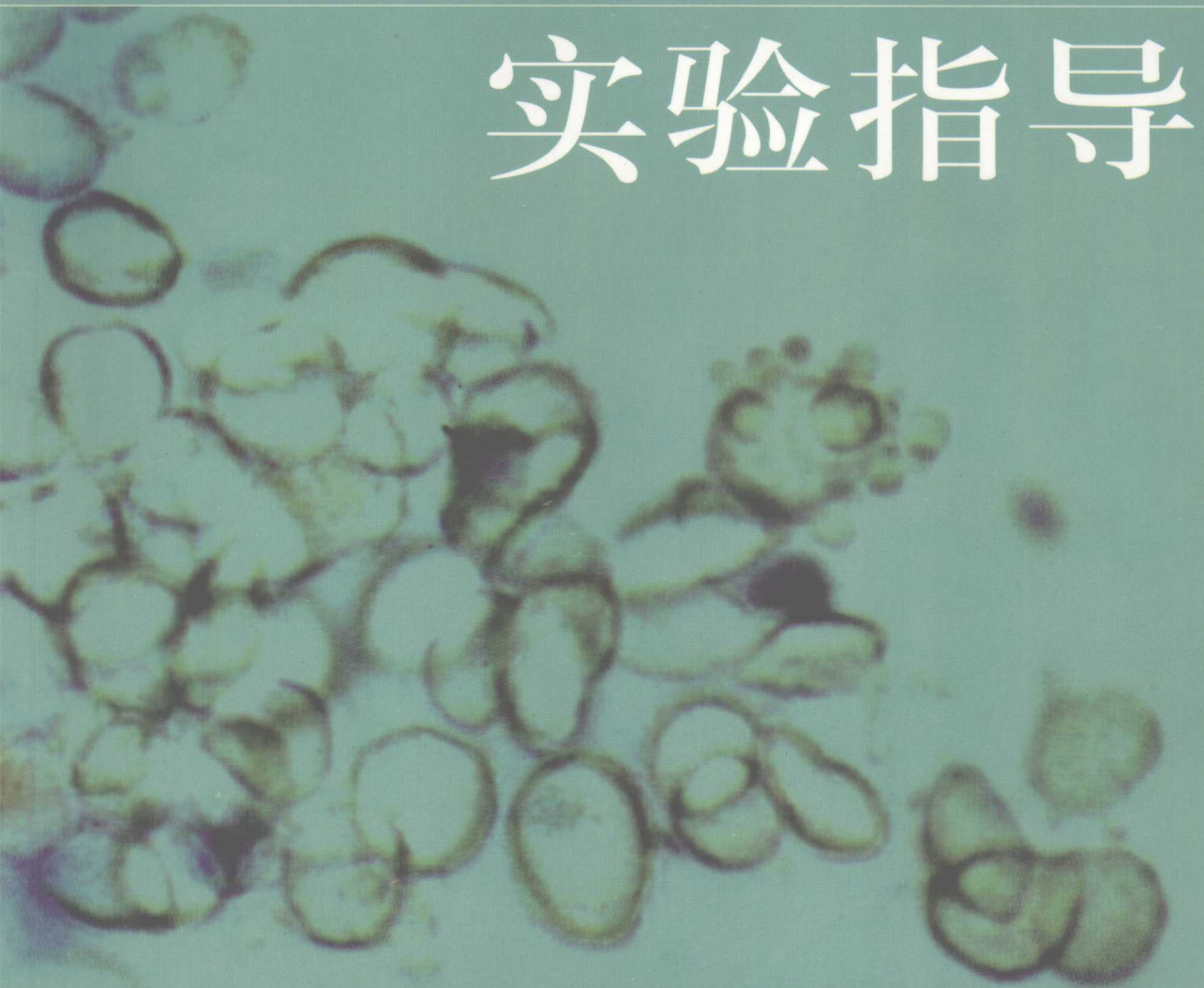


■ 主编 梁素华

YIXUESHENGWUXUE
YIXUEXIBAOSHENGWUXUE
SHIYANZHIDAO

医学生物学
医学细胞生物学
实验指导



四川出版集团·四川科学技术出版社

医学生物学和医学细胞 生物学实验指导

主 编 梁素华

四川出版集团·四川科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学生物学和医学细胞生物学实验指导/梁素华主编. 1 版
- 成都: 四川科学技术出版社, 2007. 8
ISBN 978 - 7 - 5364 - 6264 - 9

I. 医… II. 梁… III. ①医学: 生物学 - 实验 - 医学院校 - 教材 ②医学: 细胞生物学 - 实验 - 医学院校 - 教材
IV. R318 - 33; Q2 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 105825 号

医学生物学和医学细胞生物学实验指导

主 编 梁素华
责任编辑 牛小红
封面设计 李 庆
版面设计 康永光
责任出版 邓一羽
出版发行 四川出版集团·四川科学技术出版社
成都市三洞桥路 12 号 邮政编码 610031
成品尺寸 260mm × 185mm
印张 6.25 字数 130 千 插页 2
印 刷 郫县犀浦印刷厂
版 次 2007 年 8 月成都第一版
印 次 2007 年 8 月成都第一次印刷
定 价 13.00 元
ISBN 978 - 7 - 5364 - 6264 - 9

■ 版权所有·翻印必究 ■

■ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。
■ 如需购本书, 请与本社邮购组联系。
地址/成都市三洞桥路 12 号 电话/(028)87734081
邮政编码/610031

本书编委会名单

主 编 梁素华

副主编 许 勇

编 委 刘 云 许 勇 陈 康 余 红

隆淑芬 杨小林 杨春蕾 梁素华

税青林 陶宏凯

前 言

医学生物学和医学细胞生物学是高等医学院校不可缺少的两门重要的基础学科,它们的主要任务是为医科学生学习基础医学课程、临床医学课程及临床实践奠定理论和实验基础。实验教学的目的一是巩固和强化课堂所学的理论知识,补充一些课堂理论讲授学不到的内容;二是通过基本技能和实际操作的训练,培养学生的动手能力及理论联系实际、实事求是的科学态度;三是通过一些综合性探索性实验的开设,培养医学生综合分析问题和解决问题的能力及创造性思维能力,提高学生的综合素质。

为了满足实验教学的需要,我们组织了四川省内4所高等院校中多年从事医学生物学和医学细胞生物学教学的具有丰富教学经验的老师编写了这本《医学生物学和医学细胞生物学实验指导》。全书一共有16个实验项目,其中既有巩固和强化基础知识、基本理论及基本技能训练的实验,也有部分着重培养学生能力的探索性和综合性实验。

参加该书编写的院校有四川大学、成都中医药大学、泸州医学院及川北医学院等。虽然编者对该书的编写花了不少的时间和精力,但由于我们水平有限,可能会存在一些问题。请使用本书的老师和同学们提出宝贵意见,以使本书日臻完善。

梁素华

2007年7月

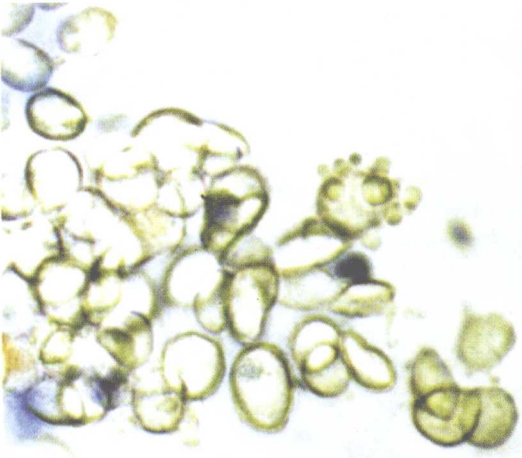


图 1
人肝癌细胞(示细胞凋亡 高倍镜)

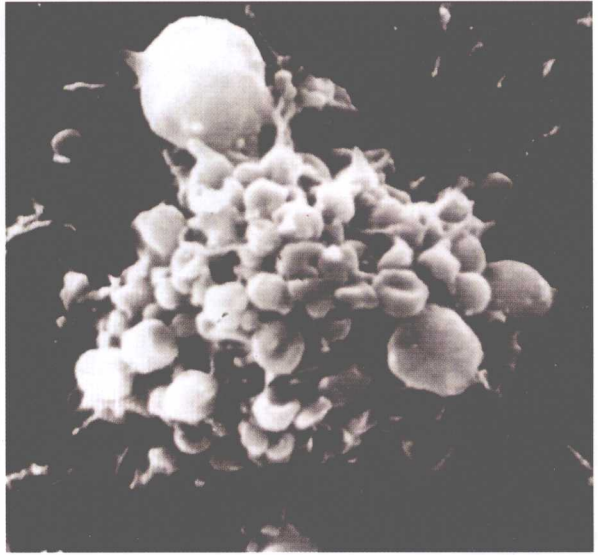


图 2
人肝癌细胞(示细胞凋亡
扫描电镜)

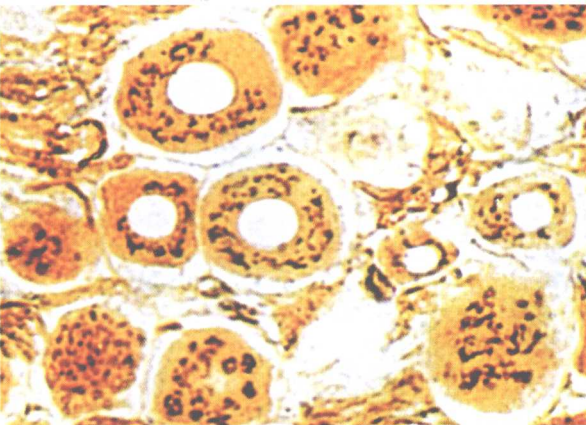


图 3
家兔脊神经节细胞 (示高尔基复合体
高倍镜)



图4
动物细胞(示内质网 透射电镜)

图5
洋葱根尖细胞有丝分裂各期(高倍镜)

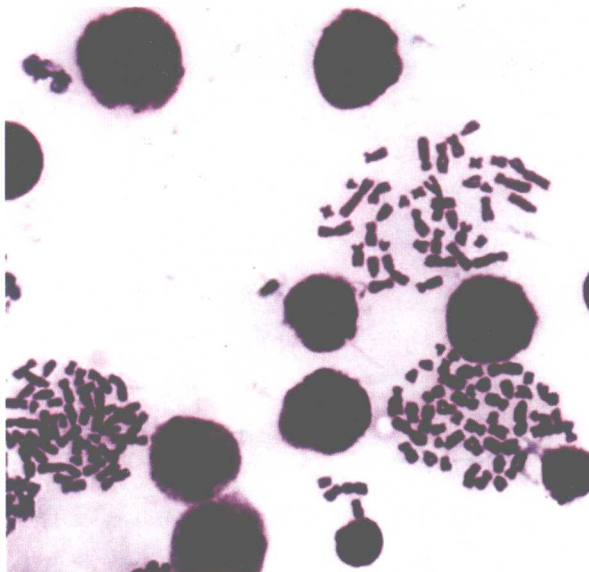
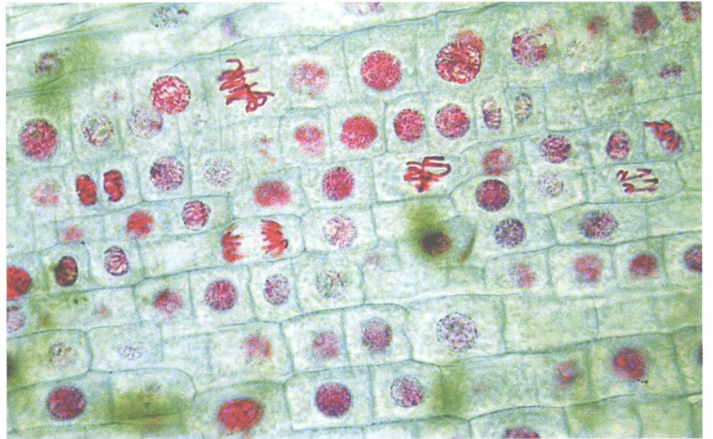


图6
人外周血淋巴细胞中期染色体(高倍镜)

图 7
马蛔虫受精卵有丝分裂(中期 极面观)

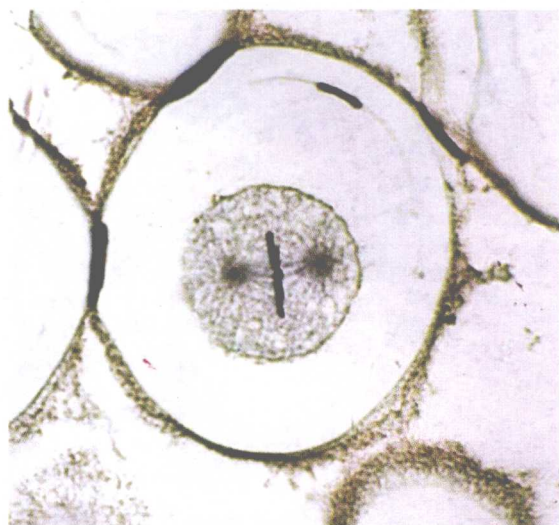
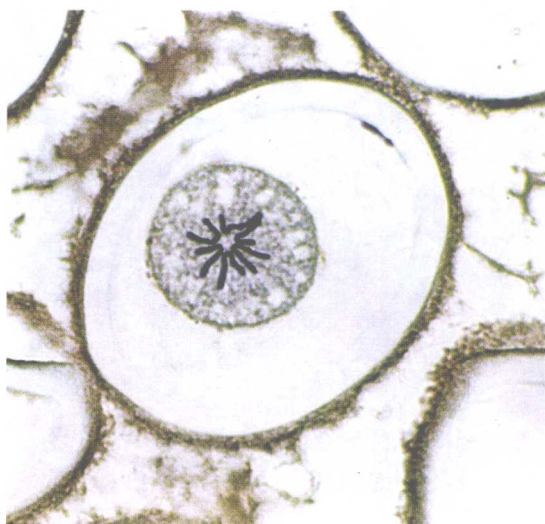


图 8
马蛔虫受精卵有丝分裂(中期 侧面观)

图 9
马蛔虫受精卵有丝分裂(后期)



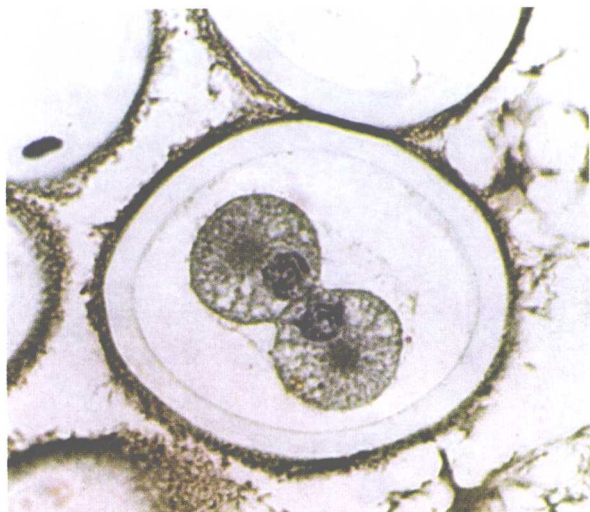


图 10
马蛔虫受精卵有丝分裂(末期)

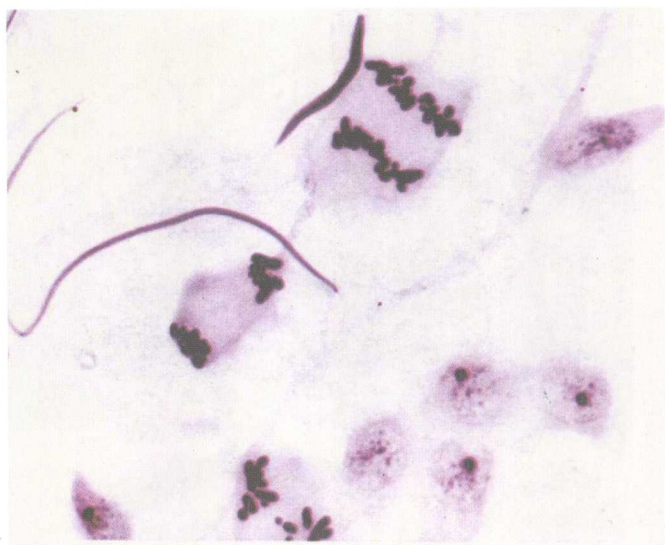


图 11
蝗虫精母细胞减数分裂(后期 I)

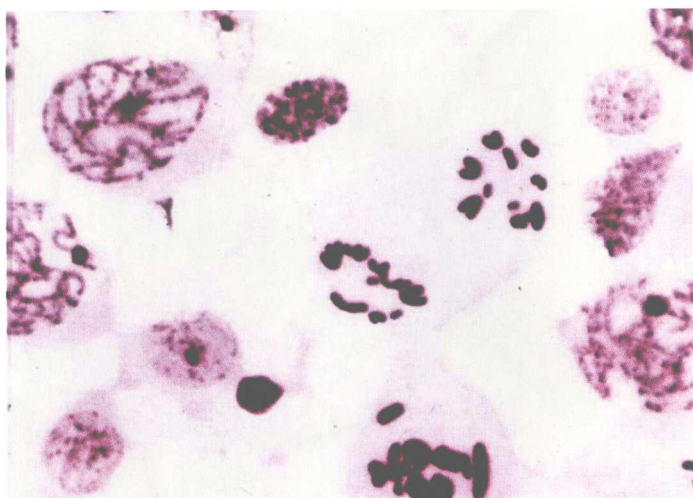


图 12
蝗虫精母细胞减数分裂
(中期 II 极面观)

目 录

实验规则	1
实验一 显微镜的构造及使用	2
实验二 细胞形态结构的观察	9
实验三 细胞的化学成分	13
实验四 光镜下的细胞器及细胞骨架	18
实验五 细胞生理活动的观察	23
实验六 小鼠胚胎细胞的原代培养	26
实验七 小鼠胚胎细胞的传代培养	30
实验八 流式细胞术	34
实验九 细胞凋亡的检测	39
I 光镜下的形态学观察	39
II DNA 凝胶电泳	42
实验十 细胞分裂	45
实验十一 小白鼠骨髓细胞染色体标本的制备与观察	53
实验十二 人外周血淋巴细胞培养、染色体标本的制备、观察及核型分析	56
实验十三 染色体显带、银染及姊妹染色单体交换标本的制作与观察	61
实验十四 性染色质标本的制备、观察及性别鉴定	66
实验十五 家兔的解剖	70
实验十六 系谱分析	88

实验规则

医学生物学和医学细胞生物学实验是医学生物学和医学细胞生物学课程的一个重要组成部分。通过实验,一是可以印证和巩固课堂所学的理论知识,并且补充一些课堂理论讲授学不到的内容;二是可通过基本技能和实际操作的训练,培养医学生理论联系实际和实事求是的科学态度。通过一些探索性实验,可培养和启发医学生的创造性思维能力,对提高学生的科技素质具有极其重要的意义。为了保证实验课的学习效果,特订出以下规则,希望学生自觉遵守。

一、实验课前必须对实验指导和教材中有关实验内容进行预习,要求对本次实验的目的、内容和主要操作过程有概略的了解。

二、听指导老师讲解后再进行实验,切勿任意移动示教和陈列标本,以保证实验室的秩序,避免损坏公物。

三、实验时应保持严肃、认真、安静,不得彼此谈笑、高声喧哗或随意离座在室内走动。凡已排定的座次、配备的显微镜、实验材料、标本和用具等,均不得随意调换或携出。

四、实验过程中要按实验指导的要求认真操作,详细观察,作好实验报告,按时完成指定的作业。

五、要爱护国家财产,厉行节约,珍惜各种仪器设备、标本、药品和材料,如有损坏应立即向指导老师报告。根据损坏的原因,酌情处理。

六、实验完毕后,应将实验用具洗净放回原处;打扫实验室清洁,保持实验室整洁;关好水电及门窗等。

七、遵守请假制度,不得无故缺课、迟到或早退。

(川北医学院 梁素华)

实验一 显微镜的构造及使用

目的要求

1. 熟悉显微镜的结构和主要功能。
2. 掌握显微镜的正确使用方法。
3. 了解显微镜的维护方法。

实验用品

一、器材

普通光学显微镜。

二、材料

1. 家兔肌肉、肝、脾及肾组织切片。
2. 光学显微镜构造图、擦镜纸。

三、试剂

擦镜油(100%酒精和乙醚等量混合)、香柏油。

显微镜的类型

一、光学显微镜

(一) 普通光学显微镜

普通光学显微镜(ordinary light microscope, OLM)是应用最为广泛的显微镜,放大倍数为1 000~1 500倍。用于观察细胞的一般形态结构,可看到细胞核、核仁、细胞膜、线粒体、中心体、高尔基复合体及染色体等。

(二) 倒置显微镜

倒置显微镜(inverted microscope)的物镜位于标本的下方,光源位于标本的上方。该种显微镜主要用于细胞培养等活体标本的观察。

(三) 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)的特点是使用中央遮光板或暗视野集光器,使

光线通过集光器透镜边缘,倾斜地照射在标本上,经标本的反射或散射后,再射入物镜内,因而整个视野是暗的,所观察到的是被检物体的衍射光图像。暗视野显微镜一般用于观察微小生物的运动、活细胞的结构及细胞内微粒的运动等。

(四) 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)是由普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等)组成。荧光光源一般采用超高压汞灯(50~200W),经过激发滤片系统发出一定波长的激发光(如紫外光或紫蓝光),激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光,再通过物镜、目镜的放大进行观察。荧光显微镜主要用于研究细胞的结构、功能及化学成分等。

(五) 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)的主要结构特点是光学系统中有一套特殊装置(如环状光圈和带相板的物镜等),能改变直射光或衍射光的相位;并利用光的衍射和干涉现象,把相差变成振幅差(明暗差),增强反差,以利于观察活体标本或未经染色的标本。

(六) 共焦点激光扫描显微镜

共焦点激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)的特点是物镜和聚光镜同时聚焦到一个小点,即共聚焦。其优点是实现了点照明,保证只使来自聚焦点的光成像,再加上图像信息的计算机三维重建处理,使观察的标本图像更加清晰。共焦点激光扫描显微镜可用于活体胚胎,大脑皮层内微循环,细胞内网络结构如内膜系统、细胞骨架及原位染色体等的观察。

(七) 电视显微镜

电视显微镜(video microscope)又叫智能显微镜,它是将普通光学显微镜与彩色高分辨摄像头、高保真录像机和彩色监视器结合制成,使观察效果得到很大的提高并能有效记录。如配上彩色高分辨数码相机、高清晰度彩色打印机,就可在观察标本的同时得到高清晰度图片。

二、电子显微镜

德国科学家 Max Knolls 和 Ernst Ruska 于 1932 年发明了电子显微镜(electron microscope)。电子显微镜的发明和应用,使细胞生物学的研究由显微水平跃进到亚微水平,巨大的推动了细胞生物学的发展。

(一) 透射电子显微镜

透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)由电子枪发射的高速电子束(电子射线)经高压加速和聚光透镜的聚焦,然后穿过样品,再经过多级电磁透镜(物镜、中间镜、投影镜)的放大,最后将高度放大的图像显示在荧光屏上或记录在照相装置中。用于透射电子显微镜观察的样品,必须做成超薄切片,一般厚度为 30~60nm。

(二) 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)是利用由电子枪发射出并经过

加速、聚集形成的一束很细小的电子束,在样品表面扫描,电子束中的电子与样品中的原子作用可产生二次电子。二次电子信号的大小依样品表面的外形而异,因而利用反射回来的二次电子信号,经收集放大,在荧光屏上显示出样品表面高度放大的立体图像。用于扫描电子显微镜观察的样品不必做成超薄切片,制备较简单。

(三) 扫描隧道电子显微镜

1981年,由IBM苏黎世实验室的Binnig等人发明了扫描隧道电子显微镜(scanning tunneling microscope, STM),该成果获1986年度的诺贝尔物理学奖。STM是根据量子隧道效应而设计,可在原子水平上显示物体的表面结构。其分辨力在常温常压下可达纳米以下,高于透射电子显微镜。用扫描隧道电子显微镜可直接观察DNA、DNA-蛋白质的表面形态,也可对生物膜进行分析。

此外,还有几种电子显微镜,如超高压电子显微镜(ultravoltage electron microscope, UEM)、扫描透射电子显微镜(scanning-transmission electron microscope, STEM)及分析电子显微镜(analyzing electron microscope, AEM)等。

显微镜的结构和功能

在细胞生物学和医学教学、科研及临床工作中使用的普通光学显微镜有直立式和倾斜式(图1)两种类型,其结构可分为机械、照明和光学三部分。

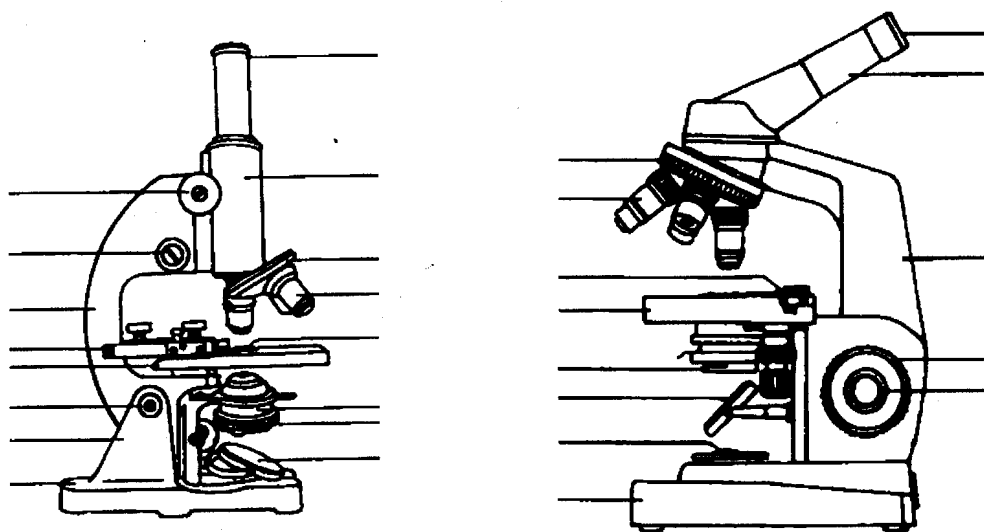


图1 普通光学显微镜的构造示意

左:直立式显微镜

右:倾斜式显微镜

一、机械部分

(一) 镜座

镜座是显微镜的基座,用以支持和稳定镜体。

(二) 镜柱

镜柱是与镜座和镜臂相连的垂直结构。

(三) 调焦器

调焦器位于镜柱上,呈同心圆式排列,有大小两种螺旋。调焦器的功能是调节焦距,大螺旋为粗调焦器,可使镜台较快速度地升降,适用于低倍镜对焦;小螺旋为细调焦器,可使镜台缓慢升降,用作较精细的调节,适用于高倍镜和油镜的调焦。

(四) 镜臂

镜臂位于镜柱上方,略呈弓形,便于握提的结构。直立式显微镜在镜臂和镜柱之间有一可动关节称为倾斜关节,使用时可适当倾斜,但倾斜角度不应超过 45° ,以免显微镜翻倒。

(五) 镜筒

镜筒是位于镜臂上方的圆筒,上端装有目镜,下端连接物镜转换器。分单筒式和双筒式两种。

(六) 物镜转换器

物镜转换器(旋转盘)装在镜筒的下方,呈圆盘状,下面有3~4个物镜孔,可安装不同放大倍数的物镜。换用物镜时,可转动旋转盘,注意一定要将旋转盘边缘上的缺刻和基座上的“T”形卡相扣合,使物镜与光轴合轴,否则无法观察标本。

(七) 镜台

镜台(载物台)是位于镜臂前方的方形或圆形平台,用以放置玻片标本。镜台中央有一通光孔,两侧有一对压片夹,用以固定玻片标本。有的显微镜装有推片器,既可固定标本,又可前后左右移动,推片器上有纵横游标尺,可利用游标尺上的刻度作为标记,以便寻找物像。

二、照明部分

显微镜的照明装置由光源、反光镜、集光器和光圈等部分组成。

(一) 光源

显微镜有不带光源和带光源的两类。前者利用自然光源或人工光源照明;后者为电光源照明,电光源灯一般装在镜座内或镜座后的灯壳中,可以使用镜座侧面的电压调节器调节光源强度。

(二) 反光镜

反光镜(mirror)装在镜座上,位于镜柱的前方,可向各个方向转动,把光线反射入聚光镜。反光镜的一面是平面镜,另一面是凹面镜。平面镜只有反光作用,一般用于较强光线和固定光源。凹面镜既有反光作用,也有聚光作用,适用于较弱光和散射光。有时在使用平面镜时,视野内会出现窗外景物或窗框等,可下降聚光镜或使用凹面镜以消除之。

(三) 集光器

集光器(condenser)又名聚光器,位于镜台通光孔下方,由一组透镜组成,可使反光镜

反射来的光线集中于标本上。在镜柱的左侧面有一集光器升降螺旋,可使集光器升降。集光器上升时光线增强,下降时光线减弱。

(四) 光圈

光圈(diaphragm)又叫虹彩光圈或光阑,位于集光器下方,由许多金属薄片组成。侧面有一光阑小柄,拨动小柄可使光圈扩大或缩小,以调节进光量。

三、光学部分

(一) 目镜

目镜(ocular)为短筒状,插入镜筒的上端。目镜上面刻有 $10\times$ 或 $15\times$ 等符号,表示其放大倍数。有的目镜筒内有一指针,用以指明视野中观察物像的部位,以利示教和提问。

(二) 物镜

物镜(objective)装在物镜转换器下方,依放大倍数不同分为低倍镜、高倍镜和油镜。低倍镜短细,镜孔直径最大,放大倍数一般为 $10\times$;高倍镜较长,镜孔直径较小,放大倍数为 $40\times$ 、 $45\times$ 或 $60\times$;油镜最长,但镜孔直径最小,放大倍数为 $100\times$ 。

通常在物镜上刻有相应的标记,如在 $10\times$ 的物镜上刻有: $10/0.25$ 和 $160/0.17$ 。 10 为物镜放大倍数; 0.25 为镜口率; 160 为镜筒长度, 0.17 为盖玻片厚度,二者的单位均为毫米。

镜口率又称数值孔径(numerical aperture,简写为N.A.)*,可以反映物镜分辨力的大小,数字越大,表示分辨力越高,一般 $10\times$ 物镜的N.A.为 0.25 ; $40\times$ 物镜的N.A.为 0.65 ; $100\times$ 物镜的N.A.为 1.25 等。

显微镜的总放大倍数等于目镜和物镜放大倍数的乘积。如:目镜 $10\times$ 、物镜 $100\times$,其放大倍数为 $10\times 100=1000$ 倍。

显微镜的使用

在使用显微镜时,应右手握镜臂,左手托镜座,从镜盒中取出显微镜,轻放在自己座位左前方的实验台上,距离实验台边缘 $5\sim 6\text{cm}$ 处为宜。直立式显微镜可使用倾斜关节,让镜筒略向自己倾斜(但不能超过 45°),以便观察。

一、低倍镜的使用

(一) 对光

先转动粗调焦器,使镜筒略升高,再旋转物镜转换器,使低倍镜对准通光孔(可听到轻微的碰撞声)。然后打开光圈,上升集光器,双眼睁开,用左眼对准目镜观察,反复转动反光镜,直到视野内光线明亮均匀为止。

* $N.A. = n \cdot \sin\theta$ N.A.为镜口率, n 为介质的折射率, $\sin\theta$ 为透镜视锥半顶角的正弦值。

(二) 放片

取一张玻片标本,认清标本的正反面,将正面朝上,用压片夹或推片器固定。然后调节玻片,将要观察的标本对准通光孔的中央。

(三) 调焦

先从侧面注视低倍镜,转动粗调焦器,使低倍镜距玻片标本约0.5cm。然后用左眼观察视野,向相反的方向缓慢转动粗调焦器,使低倍镜慢慢上升,当视野中出现物像时,再用细调焦器调节,直到物像清晰为止。

如果在调节焦距时,物镜与标本之间的距离已超过工作距离(指显微镜物像调节清晰时,物镜最下面透镜的表面与盖玻片上表面的距离)仍未见到物像,则应该严格按上述步骤重新操作。

如果物像不在视野中央,可前后左右移动标本,注意玻片移动的方向与物像移动的方向相反。

如果光线太强或太弱,可慢慢地缩小或扩大光圈;也可下降或上升集光器,找到最合适的光亮度,最强的光线不一定是合适的。

二、高倍镜的使用

(一)在低倍镜下找到物像后,将要放大观察的部分移至视野正中央,并调节清晰。

(二)从侧面注视,移走低倍镜转换高倍镜。

(三)从目镜中观察,可见视野中有不太清晰的物像,此时慢慢地转动细调焦器,即可见到清晰的物像。注意使用高倍镜时,不要随意转动粗调焦器,以免镜筒下降幅度大而损坏标本或镜头。

如果按上述操作看不到物像,应该检查可能的原因:①目的物不在视野中,是否由于低倍镜下没有将其移至视野正中;②低倍镜的焦距是否调好,玻片标本是否放反;③物镜是否松动或有污物等。

三、油镜的使用

(一)一定要在高倍镜下,将拟用油镜观察的目的物移至视野正中央。

(二)光圈开大,集光器上升到最高位置。

(三)旋转物镜转换器,使高倍镜转开,眼睛注视侧面,在欲观察玻片标本的部位上滴一滴香柏油,转换油镜,使油镜头与香柏油接触。

(四)从目镜观察,同时慢慢上下转动细调焦器,直至出现清晰的物像。

油镜用完后,必须把镜头和标本片上的香柏油擦干净。先用拭镜纸蘸少许擦镜油将香柏油擦去后,再用干净拭镜纸擦净。无盖片的标本不能擦,以免损坏标本。临时制片因有水分,不宜用油镜观察。

标本的观察与操作练习

取家兔肌肉、肝脏、脾脏及肾组织切片,按照上述显微镜的正确使用方法,反复练习低