

HIERARCHICAL
CELL BIOLOGY
EXPERIMENT

薛雅蓉 张 晶 华子春◎主编

| 细胞生物学 | 层次化实验指导

(配套数字化资源)



科学出版社

细胞生物学层次化实验 指导（配套数字化资源）

薛雅蓉 张 晶 华子春 主编



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材包括文字和数字化资源两大部分内容,填补了国内缺少细胞生物学实验数字化教材的空白。文字部分共分为五章,前三章包含55个有代表性的细胞生物学实验,内容涵盖细胞结构与组成、细胞生理生化、细胞遗传、细胞分化等内容,依据类型、难度、用时等特点,归类为基本型细胞实验、综合型细胞实验和开放探索型细胞实验;后两章分别介绍细胞生物学著名的实验发现和细胞生物学先进仪器设备。数字化资源部分包含了近20个可通过扫描二维码等方式方便地在手机、电脑等终端观看的教学视频,内容主要为相关实验的难点操作和先进实验仪器设备的使用方法。数字化资源让纸质载体的实验教程更加生动、真实地得以展现和拓展,有利于学生自主式学习及提高教学效果。

本教材内容丰富,适合作为综合性大学、师范院校和农林、医学、药等院校生命科学及相关专业的本科生、研究生的细胞生物学实验教材。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学层次化实验指导(配套数字化资源)/薛雅蓉,张晶,华子春主编. —北京:科学出版社,2018.12

ISBN 978-7-03-059283-5

I. ①细… II. ①薛… ②张… ③华… 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(2018)第243064号

责任编辑:王玉时 文 茜/责任校对:严 娜

责任印制:吴兆东/封面设计:庆全新光

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>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年12月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2019年3月第二次印刷 印张:11

字数:261 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《细胞生物学层次化实验 指导（配套数字化资源）》 编写人员名单

主编：薛雅蓉（南京大学）

张 晶（南京大学）

华子春（南京大学）

参编（以姓氏汉语拼音为序）：

陈典华（南京大学）

侯东霞（南京大学）

林 弘（南京大学）

刘常宏（南京大学）

刘智慧（南京大学）

庞延军（南京大学）

徐文玲（安徽省安庆市科学技术局）

杨永华（南京大学）

仲昭朝（南京大学）

庄 重（南京大学）

细胞是组成生命有机体（除病毒外）的基本功能单位。细胞生物学是研究细胞结构、功能及生命活动规律的科学，是构筑生命科学体系的重要基础学科之一；其重大创新成果层出不穷，成为推动现代生命科学迅猛发展的重要支撑学科。仅 21 世纪的前 18 年里，就有 6 项细胞生物学的相关研究获得了诺贝尔生理学或医学奖。例如，2001 年细胞周期调控、2002 年细胞凋亡的遗传规律、2016 年细胞自噬机制等。与此相映衬，细胞生物学课程一直在生命科学相关学科（生命科学、医学、药学、农学等）的人才培养体系中占有重要的位置。

细胞生物学是一门实验科学，重大创新成果的获得及学科的快速发 展都离不开实验方法与技术手段的进步，因此，细胞生物学实验方法与技术教学的重要性不亚于细胞生物学理论教学。而为了取得良好的教学效果，优质的实验教材必不可少。

本教材编写团队的各位主编不仅长期从事细胞生物学领域的科学研究工作，而且多年来承担本科生及研究生的细胞生物学理论与实验教学工作，积累了丰富的理论和实验教学经验，充分了解学科发展、教学要求及学生需求；其他参编人员也在所编写内容部分有所专长。主编们在开展科学研究的同时，高度注重教学研究，坚持科学研究与教学研究并重和互动，已发表多篇与细胞生物学理论及实验相关的教学研究论文，并应不同教学对象的不同教学需求，编著了以基本实验为主的《实用细胞生物学实验》（2012 年）和兼顾基础性、综合性与创新性的《细胞生物学层次化实验指导》（2014 年）。这两本教材均反响良好，已多次印刷。《细胞生物学层次化实验指导》还获评“‘十二五’江苏省高等学校重点教材”（2014 年度）。

随着细胞生物学新技术、新方法、新手段不断涌现及应用，细胞生物学实验教材的建设也应当保持与时俱进，适应时代对细胞生物学人才培养的要求。《细胞生物学层次化实验指导》（2014 年）编写时注重实验项目的分类，遵循循序渐进的教学规律，将实验项目分为基本型、综合型、开放探索型三个层次。本教材的主要改革在于以下两个方面。

（1）考虑到细胞生物学重大科学发现过程体现了科学思维、科学研究方法和实验技术的有机统一，科学故事有助于启发学生思维，而科学仪器的不断进步和推陈出新是现代生物科学研究突飞猛进的重要推动力，因此，本教材的纸质部分增加了细胞生物学重大发现的科学故事和细胞生物学领域先进仪器使用的相关内容章节。

（2）考虑到数字化资源具有生动、易懂、有趣、仿真度高、易推广，且便于更新、扩展等优点，以及目前国内同类实验教材的数字化建设严重不足的现状，本教材在深化和优化纸质版教材内容的基础上，增加了数字化内容。这些内容由富有教学经验的编写

团队成员认真遴选、规划、撰写脚本并聘请专业的公司拍摄制作,包括先进仪器设备的原理和应用、实验操作的关键技术点的动画及视频,以及典型实验结果的真实展示。数字化内容的添加有的放矢,让纸质实验教程更加生动、真实地得以展现和拓展,有利于提高教学效果。

本教材是在网络与数字时代、在教育部重视虚拟仿真教学的背景下,将数字化教材和传统纸质教材相融合的成果,既保留了适于传统阅读的纸质版本,又融合了交互性好的数字化资源。其特色与创新在于:不仅填补了国内细胞生物学实验数字化教材的空白,同时又应用信息化平台,为自主式学习和探究式学习等新型学习方式提供了相应的新形态教材。在编写过程中,具有近 20 年细胞生物学实验执教经验的薛雅蓉老师全面负责教材编写工作的组织及大部分文字内容(包括视频脚本)的撰写,张晶老师负责部分文字内容的编写及视频拍摄的现场指导等,华子春教授全面审核教材内容,并撰写前言等内容,其他编者参与了数字化视频制作的组织、操作、审核、修改等工作。

本教材所收录实验方法的验证工作及视频的拍摄工作主要在南京大学生命科学实验教学中心完成,期间受到南京大学有关领导、中心领导与相关教师的鼎力支持;视频由南京天马行空多媒体科技有限公司制作完成;视频拍摄及教材出版得到了南京大学教务处通过立项的南京大学“十三五”实验教学改革研究课题重点项目和南京大学“十三五”规划教材建设项目的支持,资金来源为中央高校教育教学改革专项资金(2017, 2018)。此外,本教材的出版还得到编者家人和同事及科学出版社工作人员的多方支持,在此一并表示诚挚的感谢!

在教材编写过程中,编者秉持认真负责的态度,努力做到内容先进、结构合理、实验方法科学并可行,语言描述清晰而富有逻辑。但是,由于编者的水平所限,不足之处在所难免,欢迎广大读者提出宝贵意见,以便本教材能不断完善。

华子春

2018 年 10 月 15 日

本书配套的数字资源如下：

1. 部分实验操作视频



视频 1 血细胞涂片制备与染色观察



视频 2 小鼠腹腔注射与腹腔液的抽取



视频 3 单个核细胞分离与细胞计数



视频 4 压片法制备植物细胞分裂标本片



视频 5 鸡胚原代细胞获取



视频 6 贴壁细胞的传代与冻存



视频 7 Transwell 实验



视频 8 细胞划痕实验



视频 9 细胞培养准备工作

2. 部分仪器使用视频



视频 10 细胞磁分选原理及应用



视频 11 BD Accuri C6 流式细胞仪的使用



视频 12 Bio-Rad iMark 型酶标仪的使用



视频 13 相差显微镜的原理及应用



视频 14 透射电子显微镜原理及应用



视频 15 激光共聚焦显微镜的操作与应用



视频 16 超高分辨率荧光显微镜



视频 17 高内涵细胞成像和分析系统



视频 18 冷冻切片机原理及应用

目 录

前言

第一章 基本型细胞实验	001
第一节 细胞的形态、结构观察及组成显示	001
实验 1 血细胞装片和涂片的制备及染色观察	002
实验 2 植物细胞的叶绿体、线粒体及液泡观察	005
实验 3 青蛙或蟾蜍胸骨剑突软骨细胞高尔基体的中性红染色	006
实验 4 马铃薯和花生徒手切片的制备及细胞内多糖、脂肪的染色	007
实验 5 孚尔根法显示细胞中的 DNA	009
实验 6 甲基绿 - 派洛宁染色法显示细胞中的 DNA 和 RNA	010
实验 7 考马斯亮蓝染色法显示洋葱鳞茎内表皮及小鼠巨噬细胞的细胞骨架	011
实验 8 酸性磷酸酶法显示巨噬细胞溶酶体	015
实验 9 细胞中过氧化物酶体的显示	016
实验 10 酶免疫细胞化学法显示人 T 细胞表面 CD3 分子	018
实验 11 细胞大小的显微测量	019
第二节 细胞计数	021
实验 12 常规血细胞计数板计数	021
第三节 细胞生理	023
实验 13 哺乳动物红细胞膜的通透性检测	023
实验 14 植物细胞质壁分离现象观察及质壁分离法测定基态渗透值	024
实验 15 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬现象观察及吞噬活性检测	026
实验 16 台盼蓝染料排除法检测活细胞比率	028

第四节 细胞分裂	030
实验 17 压片法制备植物细胞分裂标本片及分裂各期细胞特征观察	030
实验 18 滴片法制备动物细胞分裂标本片及细胞分裂指数分析	032
第五节 细胞裂解及效果检测	034
实验 19 小鼠腹水瘤细胞裂解及乳酸脱氢酶活性检测	035
第六节 细胞器的分离	036
实验 20 植物细胞叶绿体的分离	037
实验 21 动物细胞线粒体的分离	038
第七节 细胞融合	040
实验 22 PEG 介导的细胞融合实验	041
第二章 综合型细胞实验	043
第一节 细胞的分离与分选	043
实验 23 密度梯度离心法分离血液单个核细胞	044
实验 24 免疫磁珠分选法分离小鼠脾脏 CD4 ⁺ T 淋巴细胞	046
实验 25 T 细胞的免疫荧光标记及流式细胞仪分选实验	048
第二节 细胞培养相关实验	050
实验 26 贴壁细胞的原代培养实验	051
实验 27 贴壁细胞的传代培养实验	054
实验 28 细胞冻存与解冻复苏实验	056
实验 29 动物外周血细胞培养及染色体制备实验	059
第三节 细胞增殖及细胞活力检测实验	061
实验 30 MTT 比色法检测细胞增殖与活力	062
实验 31 CCK-8 法检测细胞增殖与活力	063
第四节 细胞黏附与迁移分析	065
实验 32 肿瘤细胞黏附能力分析实验	066
实验 33 检测肿瘤细胞侵袭能力的 Transwell 小室实验	067
实验 34 肿瘤细胞迁移的划痕实验	069
第五节 细胞的激活及信号转导分子检测	070
实验 35 利用钙离子荧光探针检测细胞内 Ca ²⁺ 浓度	071
实验 36 信号蛋白磷酸化水平检测实验	073
实验 37 转录因子 NF- κ B 活性检测实验	075

第六节 哺乳动物细胞转基因及表达检测	077
实验 38 绿色荧光蛋白基因转染体外培养的小鼠成纤维细胞及表达检测	078
第七节 细胞周期调控及检测	080
实验 39 利用流式细胞术分析细胞周期时相	081
实验 40 细胞周期蛋白 D1 基因转染细胞及细胞周期检测	084
实验 41 胸腺嘧啶脱氧核苷 (TdR) 双阻断法同步化培养的动物细胞	086
实验 42 秋水仙胺抑制法分离贴壁培养的哺乳动物 M 期细胞	088
实验 43 植物细胞中期同步化诱导	089
第三章 开放探索型细胞实验	091
第一节 细胞凋亡及细胞胀亡的诱导及检测	091
实验 44 凋亡细胞及胀亡细胞的形态学检测	092
实验 45 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测凋亡与胀亡细胞	094
实验 46 凋亡细胞 DNA 的电泳检测	096
实验 47 TUNEL 技术原位检测凋亡细胞	098
第二节 细胞自噬的诱导及检测	101
实验 48 MDC 染色法检测巨噬细胞自噬现象	102
实验 49 GFP-LC3 基因转染法显示自噬体	104
第三节 细胞衰老的诱导与检测	105
实验 50 细胞 ROS 的流式细胞仪检测	106
实验 51 H_2O_2 诱导细胞衰老及胞内衰老相关的 β -半乳糖苷酶检测	108
第四节 细胞分化的诱导及检测	110
实验 52 骨髓造血干细胞的诱导分化实验	112
实验 53 视黄酸诱导肿瘤细胞分化及检测实验	115
第五节 小干扰 RNA 引起的基因沉默实验	117
实验 54 RNA 干扰沉默绿色荧光蛋白基因	118
第六节 细胞端粒酶活性检测实验	120
实验 55 肿瘤细胞的端粒酶活性检测	121
第四章 细胞生物学著名的实验发现	124
一、细胞膜磷脂双层的发现	125
二、线粒体的发现与功能研究	126

三、溶酶体的发现	126
四、高尔基体的发现	127
五、细胞周期调控的发现	127
六、照亮细胞的绿色荧光蛋白	128
七、细胞凋亡与线虫	129
八、蛋白质的地址签	129
第五章 细胞生物学先进仪器设备	131
第一节 细胞观察仪器	131
一、相差显微镜	131
二、透射电子显微镜	132
三、激光扫描共聚焦显微镜	134
四、超高分辨率荧光显微镜	139
五、高内涵细胞成像和分析系统	142
第二节 细胞分选设备	145
一、流式细胞仪	145
二、细胞磁分选仪	148
第三节 细胞破碎设备	150
第四节 细胞切片制作设备	151
第五节 细胞酶活等分析设备	152
附录一 本书常用溶液配制方法	155
附录二 腹水瘤小鼠模型建立方法	157
附录三 细胞培养前的准备工作	158

基本型细胞实验

第一节 细胞的形态、结构观察及组成显示

细胞的形态、结构及组成是细胞的基本特性，也是细胞研究的基础和必要工作。

要对细胞进行观察，必须先制备细胞标本片。依制片方法及特点不同，制备的细胞标本片有：装片、涂片、压片、印片、爬片、铺片、磨片、徒手切片、冰冻切片、石蜡切片、超薄切片等。其中，装片、涂片和徒手切片是最常用的制片。

由于细胞的大小（ $1\sim 30\mu\text{m}$ ）超出人肉眼的分辨率（ $100\mu\text{m}$ ），对细胞形态及结构的观察需要借助于各种显微镜。普通光学显微镜（光镜）可观察超过 $0.2\mu\text{m}$ 大小的结构，电子显微镜（电镜）可观察小于 $0.2\mu\text{m}$ 但大于 0.1nm 的结构。有自发荧光或荧光染色的结构还可借助荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

可利用已知染色试剂及化学反应原位显示细胞化学组成，并利用显微镜进行定性、定位和定量研究。这种研究细胞的科学称为细胞化学（cytochemistry），包括细胞成分的普通染色和荧光染色、酶细胞化学、免疫细胞化学、电镜细胞化学等。

普通染色指用普通光学显微镜可以观察结果的细胞结构及组分直接染色技术，如用亚甲蓝染料染细胞核、甲基绿-派洛宁（吡罗红）染 DNA 和 RNA、詹纳斯绿 B（Janus green B）染线粒体、中性红（neutral red）染液泡、碘染淀粉、油红 O 染脂肪等。

荧光染色指用针对细胞器或细胞化学成分的特异荧光探针对细胞进行染色，并借助荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察结果的技术，如用碘化丙啶（PI）、4,6-二脒基-2-二苯基吡啶（DAPI）、Hoechst33342 等染核，用 JC-1、Mito-Tracker Green 等染线粒体，DCFH-DA 染活性氧等。

酶细胞化学是利用特定酶的作用底物进行细胞内某种酶的定位与活性显示的实验技术。

免疫细胞化学（immunocytochemistry, ICC）是利用免疫学原理，用荧光素、酶、金属、发光物质等可视系统标记抗体（或抗原），然后通过特异的抗原-抗体反应，原位显示细胞及组织抗原或半抗原成分的方法。根据标记物的不同，免疫细胞化学可分为免疫酶细胞化学技术、免疫荧光细胞化学技术、免疫金-银细胞化学技术、免疫胶体铁蛋白技术、亲和免疫细胞化学技术以及免疫电子显微镜技术等，标记物分别为酶、荧光素、胶体金、胶体铁、亲和配体等。其中免疫酶细胞化学技术和免疫荧光细胞化学技术最为常用。免疫细胞化学检测范围非常广，包括各种蛋白质、多肽、核酸、部分类脂、多糖等。

电镜细胞化学是从光镜细胞化学的基础上发展起来的一种超微结构显示技术,是利用特定的化学显色反应,形成高电子密度、不溶性的反应产物沉淀在细胞原位,借助电子显微镜进行超微结构的原位分析。其中包括免疫电镜技术、电镜酶细胞化学技术等。

实验1 血细胞装片和涂片的制备及染色观察

装片法是一种最为简单、最为常用的生物组织及细胞玻片标本制备方法,是将微小的生物或从生物体上撕下、挑取的少量材料封装于载玻片与盖玻片之间制成标本。其基本上保持了细胞的原有形态及状态。动物细胞悬液,藻类、菌类、蕨类的原叶体、孢子囊,纤细的苔藓植物,被子植物的表皮、花粉粒,幼小动物等都可用装片法制备标本。

涂片法是指将细胞悬液均匀地涂布在载玻片上制备细胞标本,可用于制备各种细胞悬液的可保存光学显微镜标本片。培养的各种悬浮细胞及人医临床标本血液、骨髓、痰液、羊水、生殖道分泌物、胸腹腔渗出液等都可用涂片法制备标本。细胞涂片可用手工方法制备(常规科研实验室),也可用自动薄层液基细胞涂片技术制备(医院)。

一、实验原理

适当稀释的绵羊抗凝血及大肠杆菌菌液,制成装片后细胞密度适当,可在显微镜下观察其中的细胞形态。

而用推片法将血液制成薄的血涂片,可使血细胞呈单层排列。用含天青和伊红的复合染料如瑞氏(Wright's)染液进行染色时,细胞中的碱性物质如红细胞中的血红蛋白及嗜酸性粒细胞细胞质中的嗜酸性颗粒等与酸性染料伊红结合染成红色;细胞质中的嗜碱性颗粒与碱性染料亚甲蓝结合染成蓝色;中性粒细胞的中性颗粒呈等电状态,与伊红和亚甲蓝均不能很好地结合,染成淡紫红色。

二、实验材料、试剂及用品

1. 材料

(1) 新采集小鼠血。采集时需加肝素钠溶液抗凝,心脏采血,用于涂片制作;再用0.9% NaCl溶液(生理盐水)稀释500或1000倍,用于装片。

(2) 大肠杆菌菌液。大肠杆菌DH5 α ,液体LB培养过夜,用生理盐水稀释20倍。

2. 试剂

(1) 0.9% NaCl溶液(生理盐水)。

(2) 肝素钠溶液。用生理盐水配成180IU/mL。

(3) 瑞氏染液。瑞氏染料粉末0.1g,甲醇60mL,把染料放在研钵内,加少量甲醇研磨,使染料溶解,然后把溶解的染料倒入干净的棕色玻璃瓶,并加入甲醇至甲醇用完为止。

(4) pH6.4的磷酸盐缓冲液(PBS)。磷酸二氢钾(无水)0.3g,磷酸氢二钠(无水)0.2g,先加800mL蒸馏水溶解,调pH至6.4,再补加蒸馏水至1000mL。

3. 用品

普通光学显微镜、载玻片及盖玻片、酒精棉球、蜡笔、胶头吸管、1.5mL EP管、

吸水纸、擦镜纸等。

三、实验步骤

1. 细胞装片的制备及显微观察

(1) 细胞装片的制备。取载玻片,用胶头吸管向其中央位置分别滴加羊血细胞悬液和大肠杆菌细胞悬液,加盖玻片,制成装片。对于初次观察的细胞样品,可滴加较多量(1个自然滴,约 $50\mu\text{L}$)的细胞悬液,使标本较厚,在显微镜下调焦时可通过寻找流动的液体判断细胞层,确保所观察到的物体为细胞悬液中的细胞。当对细胞形态有了初步认识后,如要进一步观察细胞形态结构,可滴加适量(以加盖玻片后细胞悬液恰好布满整个盖玻片下面为原则)细胞悬液。为了避免加盖玻片时产生气泡,可先让盖玻片一侧边缘接触液滴边缘,待液滴沿盖玻片边缘展开后,随液体扩散缓慢放下盖玻片。

(2) 显微观察。旋转物镜转换器到 $10\times$ 物镜,先将粗准焦螺旋外旋,使标本升至最高点,然后一边用眼睛通过目镜观测标本,一边逐渐向内旋转粗准焦螺旋,直至视野中出现晃动的液体,观测细胞即在其中。如视野中细胞太小,转换物镜至 $40\times$ 高倍镜,一般稍微向外旋转细准焦螺旋即可看到清晰的物像。为了便于调焦,可用记号笔在盖玻片旁边的载玻片上画一道线,先对该线调焦,至清晰观察到所画线后,再微调焦即可调至细胞层。

观察结果:血细胞装片视野中主要为小鼠红细胞,呈圆形,细胞质均匀;另外,可以看到表面呈毛刺样的粒细胞、较大且细胞质中有颗粒的单核细胞等;大肠杆菌则为长短不一的杆状细胞。

2. 血细胞涂片的制备、染色及观察

方法详见“视频1 血细胞涂片制备与染色观察”。

(1) 清洁载玻片。使用前,必须仔细清洗,并用软布或脱脂棉蘸取70%乙醇清洁。目的是便于制片均匀;避免酸碱物质对染色的影响。



(2) 加样。用胶头吸管加1小滴(约 $10\mu\text{L}$)细胞样品于载玻片长轴一端离边缘约1cm处中央。

(3) 推片。将有样品的载玻片(A)放在实验台等平坦地方,右手持另一张载玻片(B)作为推片,用一侧短边边缘接触血滴前沿,待血滴沿载玻片B边缘展开后,使载玻片B以与载玻片A呈 $30^\circ\sim 45^\circ$ 角向前匀速移动,将血液推成厚薄适宜的血涂片。

(4) 干片。①空气干燥。在空气中晃动血涂片,使其迅速干燥。②加热干燥。握住涂片,在距离酒精灯火焰上方约5cm处晃动,加热干燥。

(5) 选区。在显微镜下观察,选取细胞分散良好、分布均匀的血膜作为染色区域,用蜡笔画圈($3\text{cm}\times 2\text{cm}$)作堤防,将欲染色区域围起来,防止染色时染料快速在载玻片上扩散而干掉。

(6) 染色。用瑞氏染液染色,先滴加适量瑞氏染液覆盖选定区域,1min后再滴加等量pH6.4的PBS稀释染液,轻轻旋转载玻片混匀,液面应浮现一层黄色金属样物质,然后静置染色15~20min。

(7) 洗去多余染液。不要倒掉染液,直接用流水或滴加蒸馏水洗去浮液,自然晾干或用吸水纸吸干。

(8) 封片。如要保存留用,可滴树胶加盖片封固。

(9) 结果显微观察。

红细胞:圆饼状无核,中间薄,周围厚;数量最多,布满整个视野。

淋巴细胞:基本圆形;比红细胞稍大。核深染且几乎占据细胞全部,一侧常有小凹陷;细胞质色淡,很少,仅在细胞核外有一薄圈。数量为白细胞中最多的,通常超过70%。

单核细胞:最大,少;细胞体圆形或椭圆形;核常偏位,形态多样(卵圆形、肾形、马蹄形等);细胞核着色比淋巴细胞核浅;核质比小于淋巴细胞。数量通常不到白细胞总数的1%。

中性粒细胞:形态不规则,外周常有突起;核腊肠状或分叶状(2~5叶),细胞质颗粒细小,染色浅。数量在白细胞中仅次于淋巴细胞,通常超过白细胞总数的20%。

嗜酸性粒细胞:细胞体圆形,直径为10~15 μm ,细胞核常为2叶,细胞质充满粗大的红色颗粒。数量占白细胞总数的2%左右,随品种与鼠龄有较大变化。

嗜碱性粒细胞:细胞呈球形,直径10~12 μm ;细胞核不规则,分叶或呈S形,着色较浅;细胞质内有大量深染的嗜碱性颗粒,有时将核覆盖。数量极少,很难找到。

血小板:最小(2~4 μm),多角形,聚集成群。

四、注意问题

(1) 涂片用血量需适宜,太多导致标本过厚、细胞重叠,不便观察;也会因干燥过慢、缓慢失水造成细胞皱缩变形;太少导致血膜太薄、细胞太稀,不便观察。

(2) 血涂片需干透后再进行染色,否则细胞在染色过程中容易脱落。

(3) 用蜡笔作堤防时画的圈要完整,以免染料从缺口处流失。

(4) 冲洗时不能先倒掉染液,以防染料沉着在血涂片上;冲洗时间不能过久,以防脱色。如血涂片上有染料颗粒沉积,可滴加甲醇,然后立即用流水冲洗;如染色不够,可补染,染色时先加PBS后加瑞氏染液。

(5) 注意染液及冲洗液的pH。瑞氏染色适宜pH为6.4~6.8,染色液偏酸或偏碱均可使细胞染色反应异常,不好辨认。

五、作业与思考题

(1) 根据观察结果,画图显示小鼠各种血细胞。

(2) 若制备细胞涂片的细胞悬液样品浓度过小,制片前需要作何预处理?

六、参考文献

安利国. 2005. 细胞生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社.

刘志兰, 杨彬, 赵宝忠. 2011. 血细胞涂片瑞氏染色法缓冲液的选择[J]. 临床检验杂志, 29(4): 252-253.

孙婉玲, 刘聪艳, 李辉, 等. 2010. 细胞涂片间期荧光原位杂交在血液系统疾病中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 18(1): 204-207.

张哲, 商建峰, 陈东, 等. 2014. 离心沉降式宫颈液基细胞涂片的常见技术问题解

析 [J]. 诊断病理学杂志, 21 (5): 314-315.

七、拓展实验

分别用等量 1mol/L 盐酸和 1mol/L NaOH 溶液与 pH6.4 的 PBS 混合后再稀释瑞氏染液染色血细胞涂片, 观察染色环境偏酸和偏碱对于染色效果的影响。

实验 2 植物细胞的叶绿体、线粒体及液泡观察

活体染色是指对生活有机体的细胞或组织能着色但又无毒的一种染色方法。意义是: 便于观察活细胞内相关结构的变化。具体染色方法有: 体内活染和体外活染 (超活染色)。体内活染动物细胞时, 常用注射法将染料注入动物体内; 体内活染植物细胞时, 可将染液加在培养基中。常用染料有: 詹纳斯绿 B、中性红、亮焦油紫、亚甲蓝、尼罗蓝 (Nile blue) 等。詹纳斯绿 B 和亮焦油紫都可用于线粒体染色, 前者主要用于体外活染, 后者可用于体内活染。中性红用于染液泡系, 包括动物细胞的吞噬泡、食物泡、植物细胞的液泡等; 中性红体内体外均可用; 亚甲蓝可用于染神经组织; 尼罗蓝可染原生动物的内核。

一、实验原理

将撕取的植物叶下表皮制备成装片可看到气孔及保卫细胞、副卫细胞、栅栏细胞等, 栅栏细胞内的叶绿体较多而大, 可不经染色而在普通光学显微镜下直接观察。细胞内的线粒体可被线粒体特异活体染料詹纳斯绿 B 染色呈现蓝绿色, 液泡可被液泡系特异活体染料中性红染色而呈红色。两种染料染色的原理是: 中性红为弱碱性染料, 专一在酸性的细胞器中积累。在中性或微碱性环境中, 活细胞的液泡吸收中性红, 进入液泡的中性红在酸性环境中解离出阳离子而呈现红色。詹纳斯绿 B 可被线粒体的细胞色素氧化酶氧化成蓝绿色。

二、实验材料、试剂及用品

1. 材料

青菜。

2. 试剂

(1) 0.04% 中性红生理盐水溶液。先配成 1% 中性红水溶液, 再用蒸馏水将 1% 中性红水溶液稀释成 0.04% 溶液, 盛棕色瓶中, 暗处保存。

(2) 0.02% 詹纳斯绿 B 生理盐水溶液。先配成 1% 詹纳斯绿 B 水溶液, 再用 0.9% NaCl 溶液将 1% 詹纳斯绿 B 水溶液稀释成 0.02% 溶液, 盛棕色瓶中, 暗处保存。

3. 用品

普通光学显微镜、单面刀片、圆头牙签、胶头吸管、载玻片与盖玻片等。

三、实验步骤

(1) 取 5 片载玻片, 分别在其中 3 片中央滴加 2 滴蒸馏水、詹纳斯绿 B 染液及中