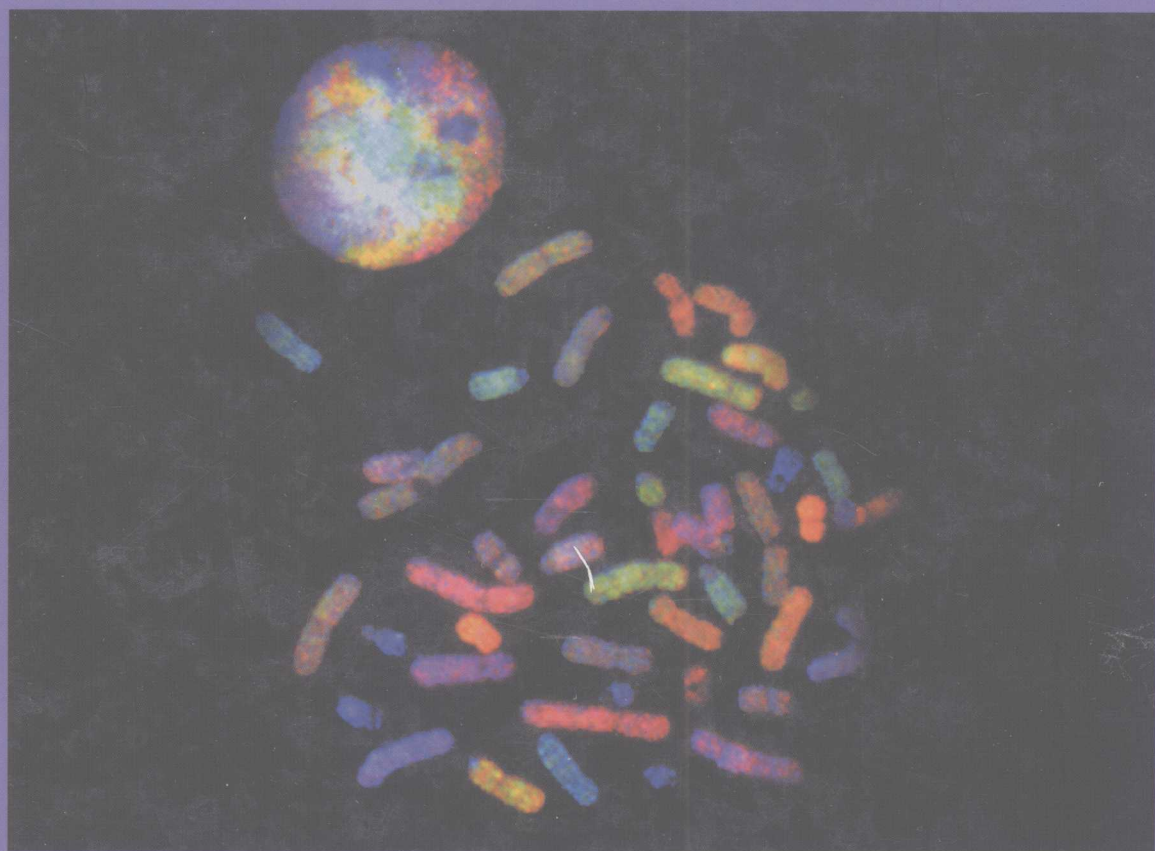


现代生物技术译丛

细胞实验指南

下册

Cells A Laboratory Manual



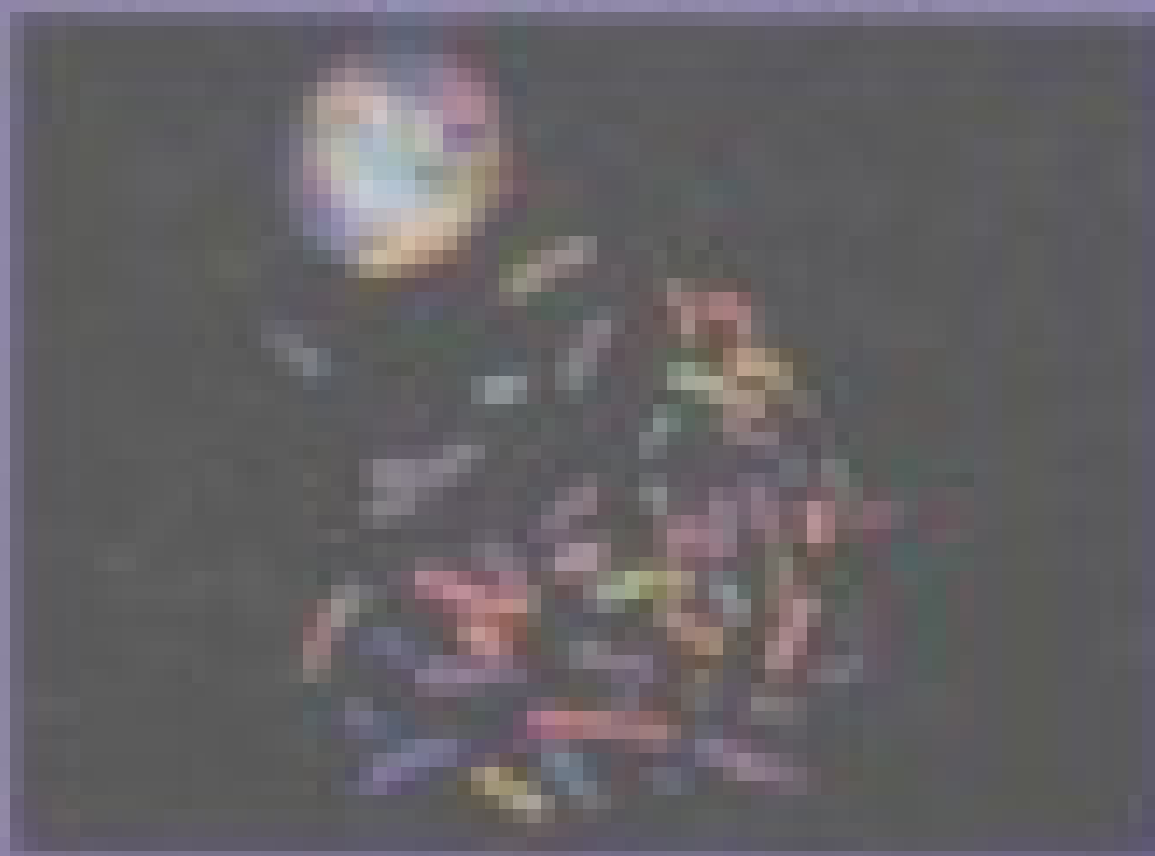
〔美〕 D. L. 斯佩克特
R. D. 戈德曼 著
L. A. 莱因万德
黄培堂 等译

科学出版社

细胞生物学实验指南

细胞实验指南

Cells: A Laboratory Manual



主编：王德成
副主编：王德成
编委：王德成
王德成 王德成
王德成 王德成

细胞实验指南

现代生物技术译丛

细胞实验指南 (下册)

[美] D. L. 斯佩克特
R. D. 戈德曼 L. A. 莱因万德 著

黄培堂 等 译

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿,是一部最新、最权威的综合性细胞实验技术操作指南。本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法,它们由三大主体组成:细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。本书内容丰富,包括从无脊椎动物到脊椎动物细胞的基本培养方法,细胞器的分离及生化分析,光学显微镜及电子显微镜水平的蛋白质定位,最近发展的共聚焦、去卷曲、多光子显微镜技术,活细胞的蛋白质动力学研究以及一系列进行蛋白质和大分子复合物显微镜研究的最先进技术方法,单拷贝基因及其转录产物的定位和原位杂交等,实为每个进行细胞和组织生物学研究的实验室乃至任何生命科学实验室所不可少的。

本书与备受称赞的冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点,对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。本书可供在不同领域从事生命科学研究的人员参考。

David L. Spector, Robert D. Goldman, Leslie A. Leinwand

Cells A Laboratory Manual

Volume 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells

Volume 2: Light Microscopy and Cell Structure

Volume 3: Subcellular Localization of Genes and Their Products

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

图字 01-1999-1642

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞实验指南 (上、下册) / [美] D. L. 斯佩克特等著; 黄培堂等译.

-北京: 科学出版社, 2001. 2

(现代生物技术译丛)

书名原文: Cells: A Laboratory

ISBN 7-03-007598-6

I. 细… II. ①斯… ②黄… III. 细胞学-实验-指南

IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 19309 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

新蕾印刷厂 印刷

山西社发行 及新华书店

2001 年 2 月第一次印刷 印张: 92 插页: 16

印数: 1-4 300 字数: 2 116 000

定价 (上下册): 220.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈杨中〉)

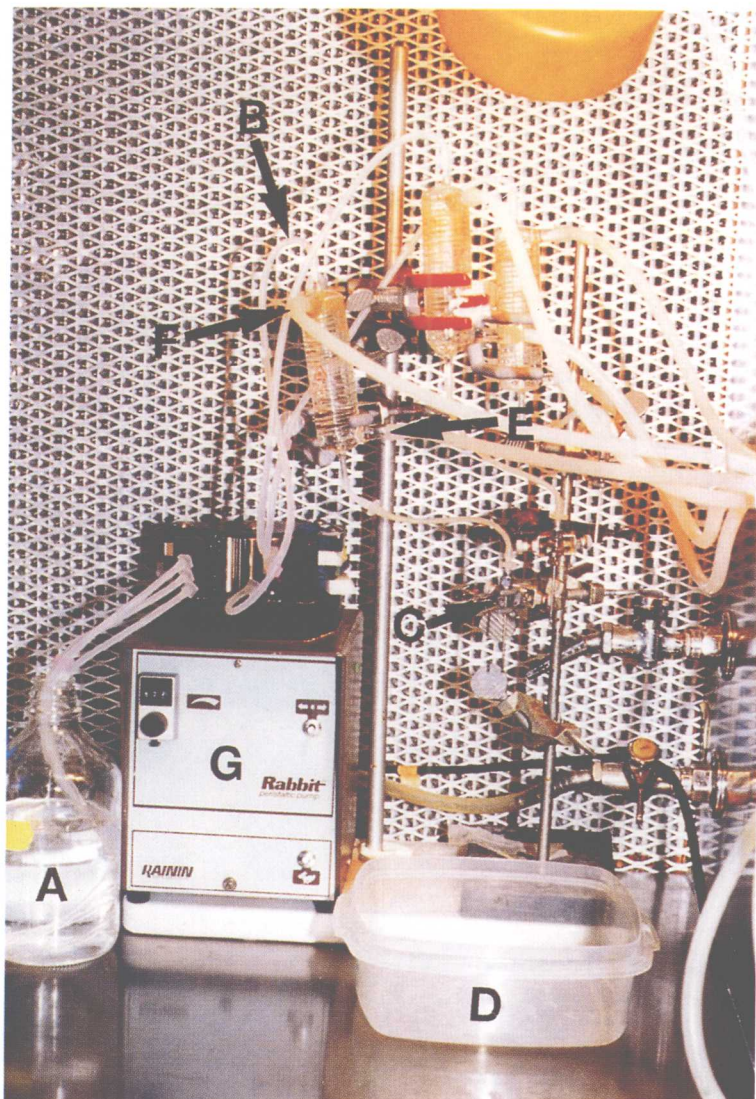
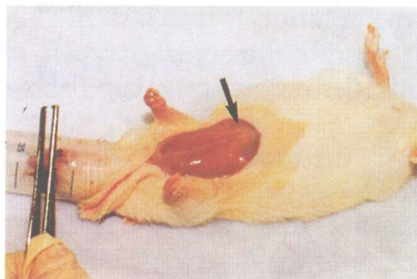
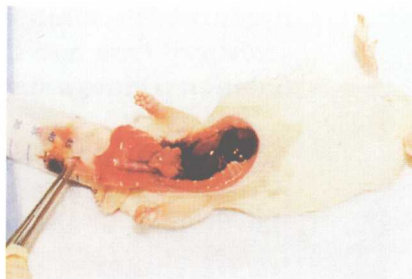


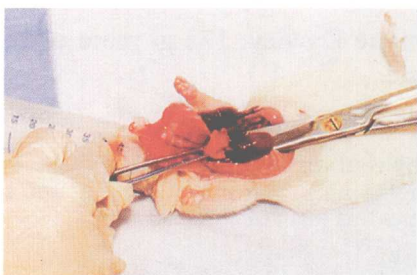
图 12.2 灌注设备。(A) 进料盆；(B) 冷凝器进水口；(C) 15# 插管（注意：尽管未显出，但在插管前应先连一个三通用以排出气泡）；(D) 废液盆（注意：再灌注时的废料盆用上一次的进料盆 A，这样，进料与废料同样适于再灌注）；(E) 冷凝器进水口，从 37℃ 水浴来的水可加热冷凝器中的缓冲液（注意：进水口要低于出水口以保证冷凝器内充满水）；(F) 回水口；(G) 蠕动泵（照片由 Alexion Pharmaceuticals, Inc. 的 J.Springhorn 提供）



A



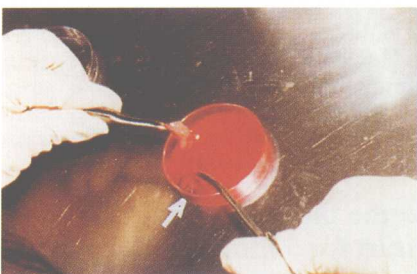
B



C



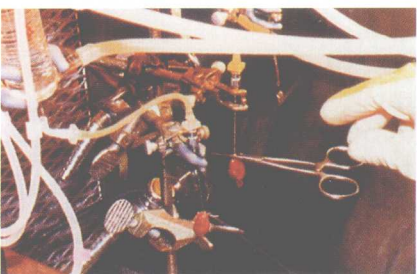
D



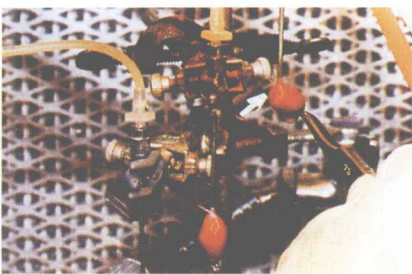
E



F



G



H

图 12.3 解剖程序系列图片。(A) 去除皮毛 (箭头指着剑突); (B) 打开胸腔; (C) 摘除心脏; (D) 处理胸腺, 以暴露主动脉弧 (箭头指向举提胸腺的方式); (E) 剔除胸腺 (箭头指向动脉弧); (F) 心脏悬挂在杆套上; (G) 用蚊式止血钳把动脉固定在插套上; (H) 检查一下杆套插进的深度。ARVM 细胞分离成功与否直接决定于心脏未被灌注的时间长短。所以应设法尽快从动物体内摘取心脏并挂在 Langendorff 设备上。从步骤 C 到 G 所花时间不应超过 2 分钟 (照片由 Alexion Pharmaceuticals, Inc. 的 J.Springhorn 提供)

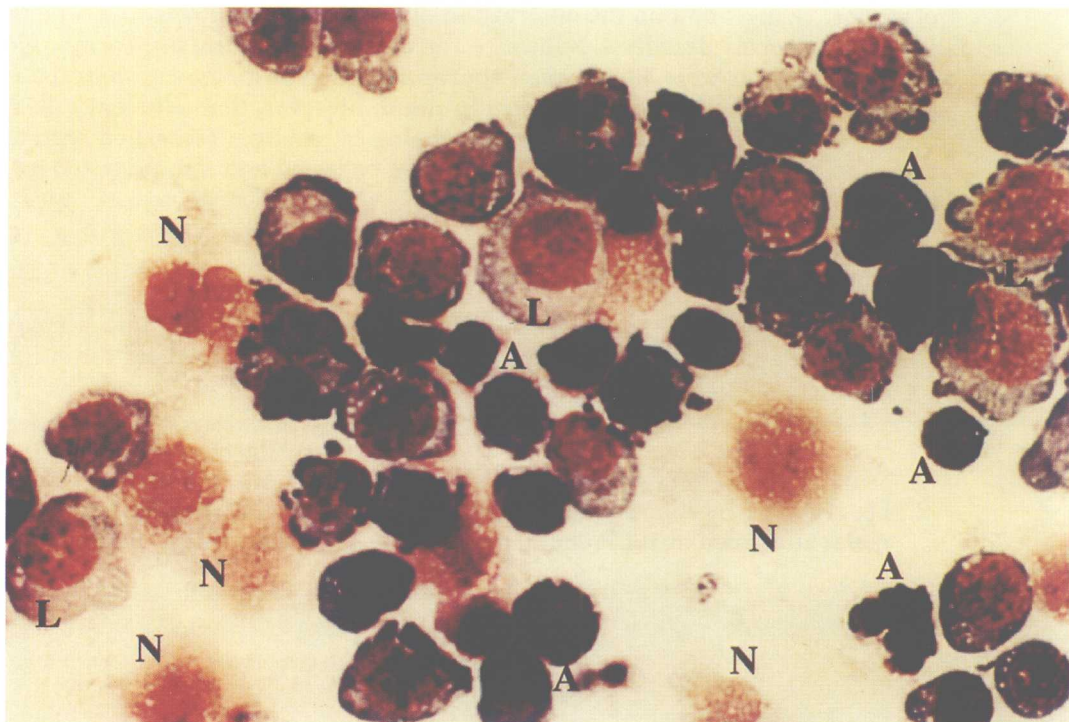
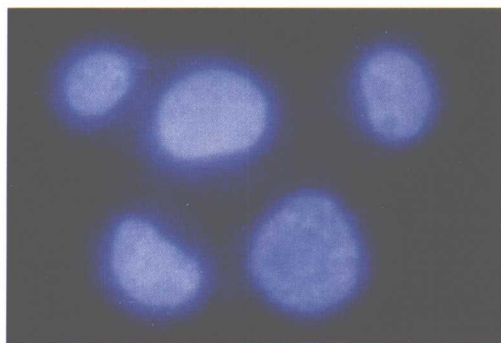
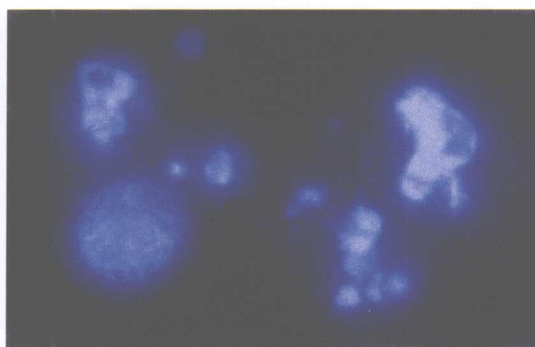


图 15.1 HL-60 细胞经 $50\mu\text{mol/L}$ 表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷(etoposide)处理 6 小时后的图中大量凋亡中的细胞 (A)，有少量活细胞 (L)，一些坏死细胞 (N)。放大倍数为 600 倍 (照片由 La.Jolla 变态反应和免疫学研究所 D.Green 提供)



对照



凋亡

图 15.2 凋亡细胞 Hoechst 染色。正常细胞核均匀着色，凋亡细胞由于染色质凝聚及核裂解其核着色不规则。放大 600 倍 (照片由 La.Jolla 变态反应与免疫学研究所 D.Green 提供)

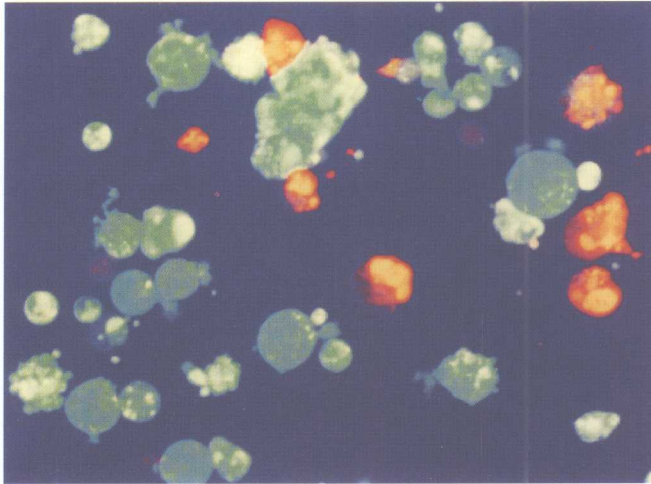


图15.3 凋亡细胞的吖啶橙/溴化乙锭染色。活细胞呈现均匀的绿色，凋亡细胞凝聚的染色质呈现黄色的斑点。凋亡细胞由于失去膜整合性，与溴化乙锭共染时呈现橙色。放大倍数为400倍（照片由 Artin Mahboubi 提供）

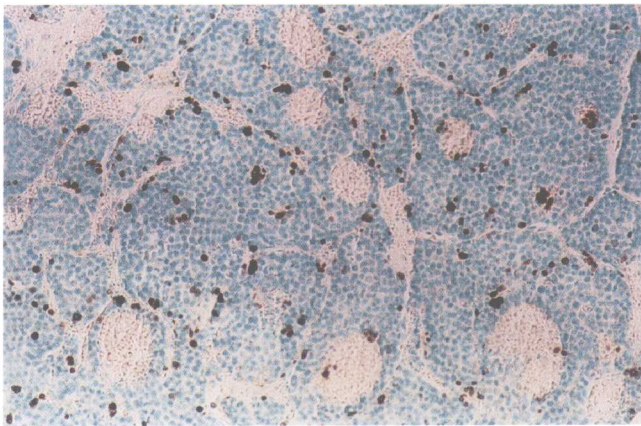
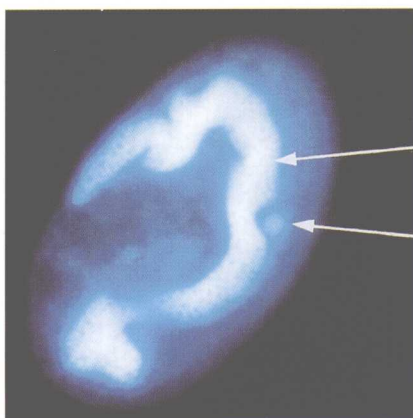
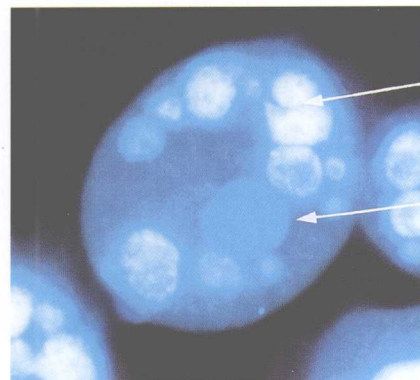


图15.6 TUNEL 标记组织切片。TUNEL 阳性细胞核呈现深棕色。组织用4% 甲醛固定，石蜡包埋，TUNEL方法处理。切片随后用1% 甲基绿复染。放大倍数为273倍（照片由 G.Bergers 和 D.Hanahan 提供）



大核

小核



退化中的大核

发育中的大核
(原基)

图17.1 游仆虫 (*Euplotes crassus*) 的营养细胞，新月形的大核以及在它背部袋状处的小核（左）；接合后的细胞，旧的大核在退化，原基在发育成为新的大核（右）（照片由 Northwestern University Medical School 的 C.Jahn 博士提供）



图 19.1 双鞭毛的单细胞绿藻 (*C.reinhardtii*)(DIC 图像) (照片由 University of Minnesota 的 P.Lefebvre 提供)

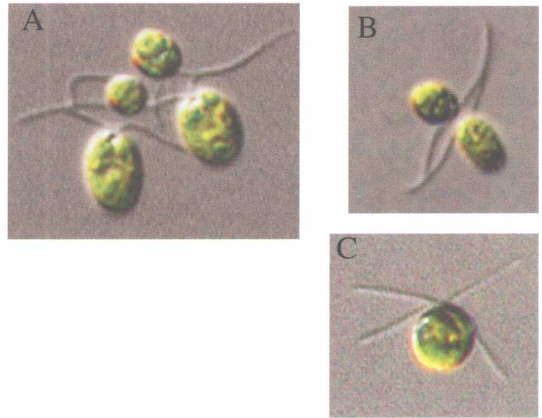


图 19.2 衣藻配子交配时相。(A) 细胞通过鞭毛凝聚成团块。(B)凝聚后大约 15 分钟, 团块分离成交配细胞对。鞭毛相互将细胞拉在一起, 准备进行细胞融合。(C) 大约 30 分钟后, 细胞对融合形成双核体四鞭毛细胞。这些细胞持续游动大约 2 小时, 之后它们再吸收鞭毛, 分化为合子 (照片由 University of Minnesota 的 P.Lefebvre 提供)

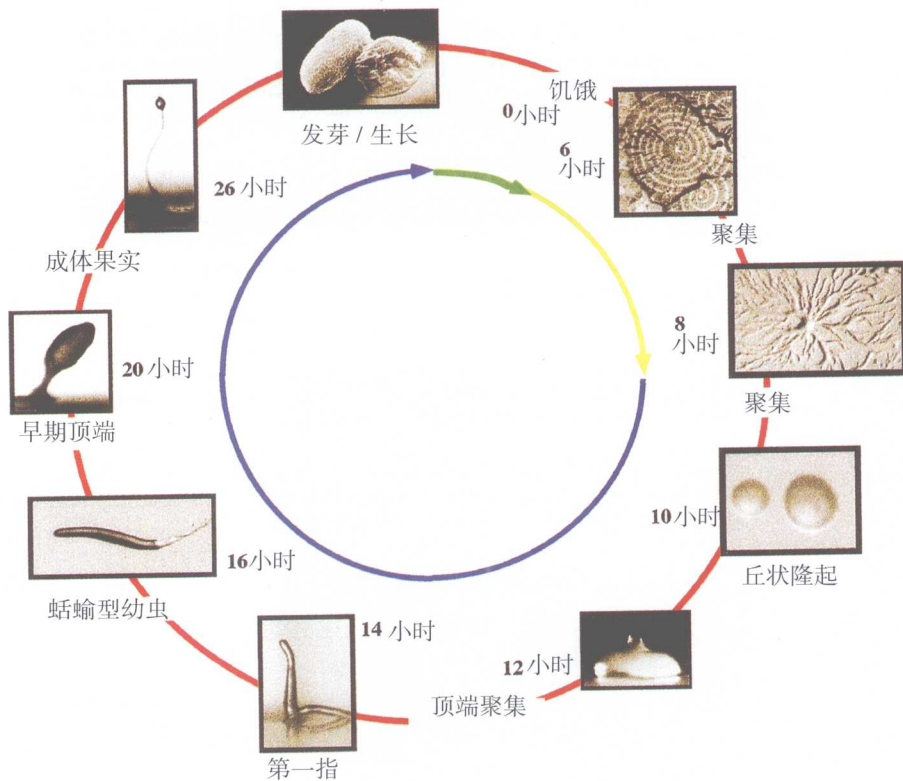


图 20.1 盘基网柄菌 (*Dictyostelium*) 的发育 (照片由 University of California, San Diego 的 R.A.Firtel 提供)

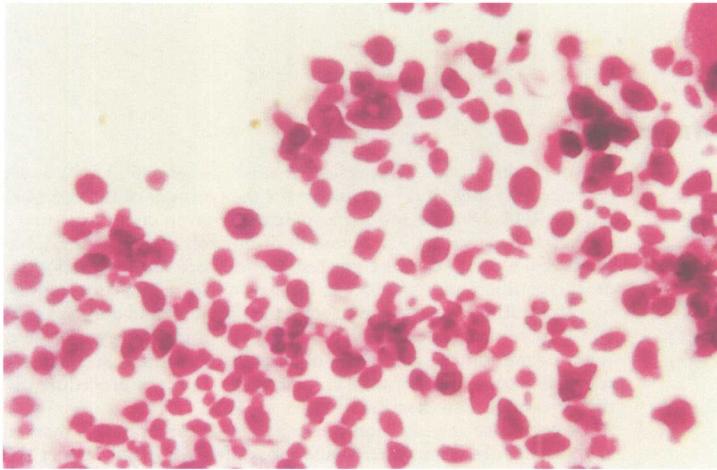


图 48.1 用光学显微镜观察按所述方法从 HeLa 细胞中分离的核仁。取出少量沉淀, 放到载玻片上, 加一滴 0.1% azure C (0.34 mol/L 蔗糖溶液), 盖上盖玻片。放大率, 3200 倍(照片由 Department of Pharmacology, Baylor College of Medicine 的 R.K.Busch 提供)

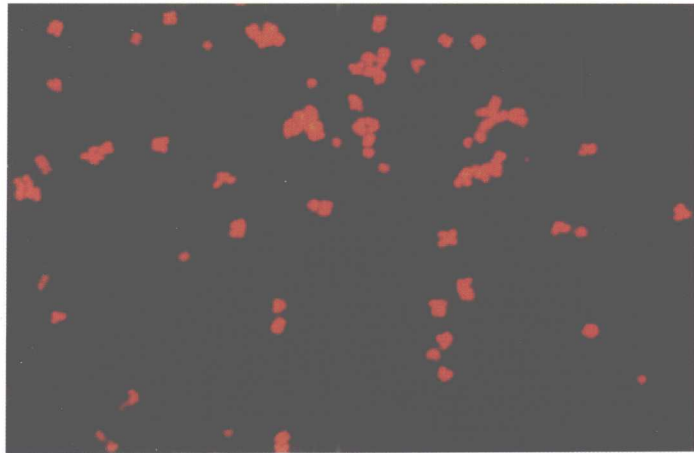


图 49.1 聚胺法分离的人中期染色质 (照片由 University of Cadiz 的 M.M.Valdivia 提供)

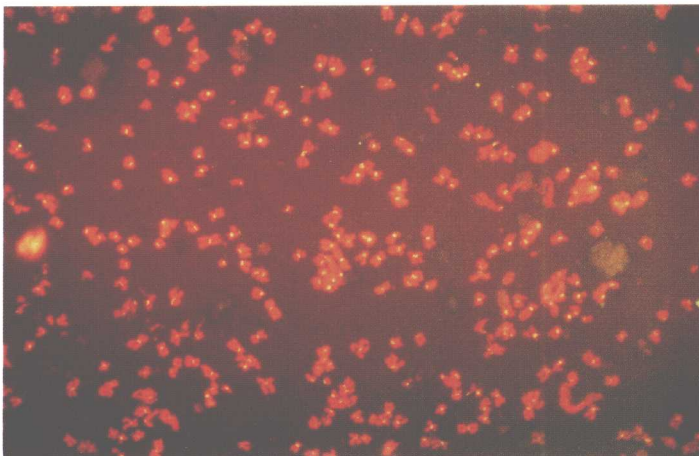


图 49.2 在乙二醇缓冲液中分离的人中期染色质, 着丝粒抗体染色 (照片由 University of Cadiz 的 M.M.Valdivia 提供)

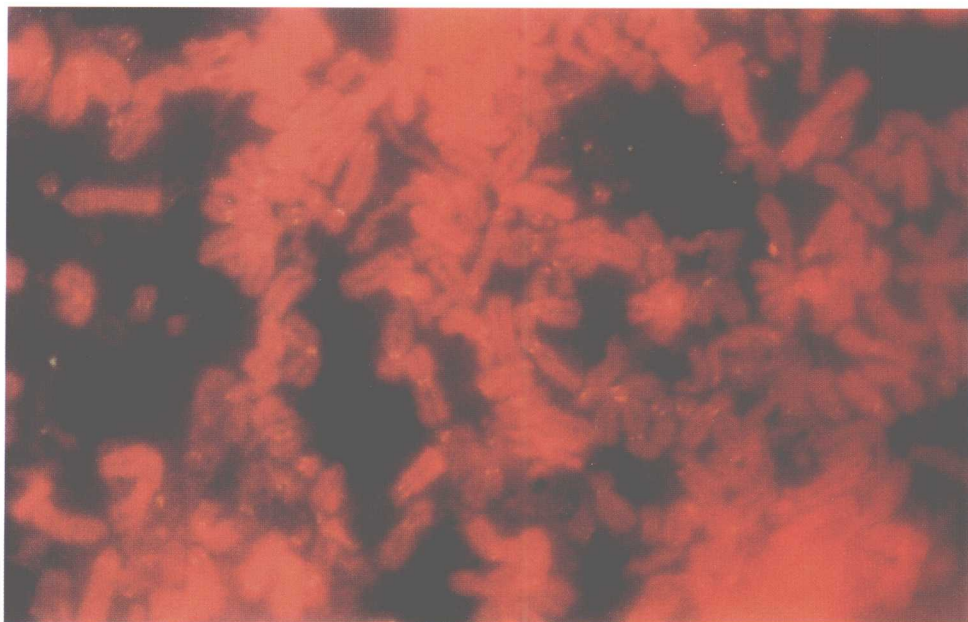


图 49.3 用不连续甘油梯度法分离纯化，用二碘化丙炔物染色的染色质。中期染色质的着丝粒通过用从自身免疫患者得到的特异血清进行免疫荧光染色展示（照片由 University of Cadiz 的 M.M.Valdivia 提供）

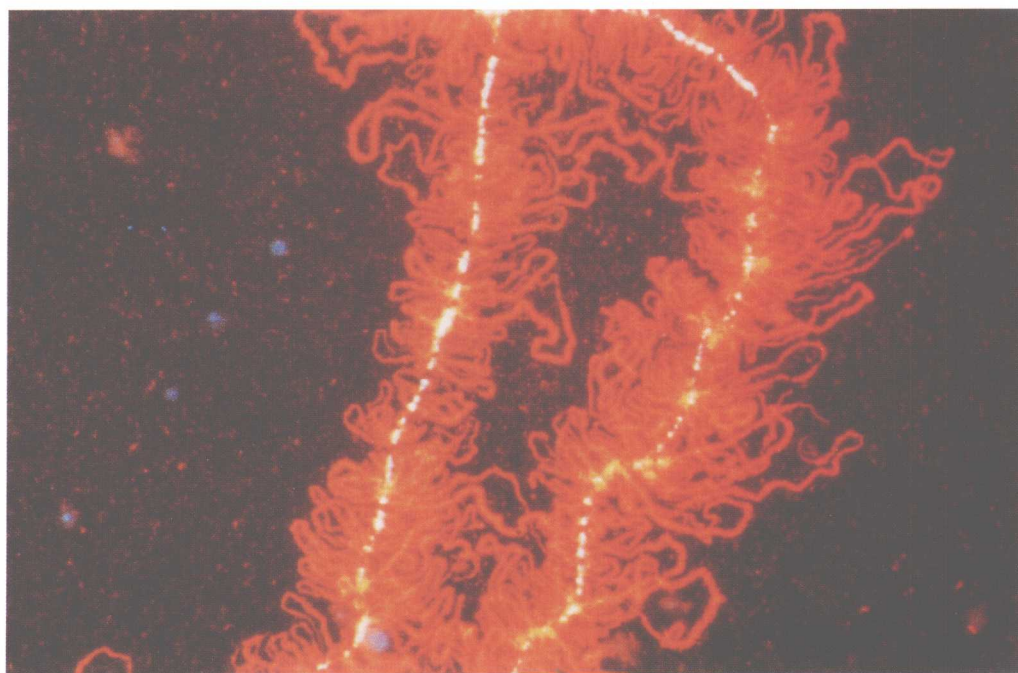


图 52.1 蝾螈 (*Notophthalmus viridescens*) 的灯刷染色体局部图，用初始转录物相关蛋白的抗体进行免疫标记(橙色)，用DAPI复染，显示染色粒上非活跃的DNA(白色)(照片由Mark B.Roth和Joseph G.Gall 提供)

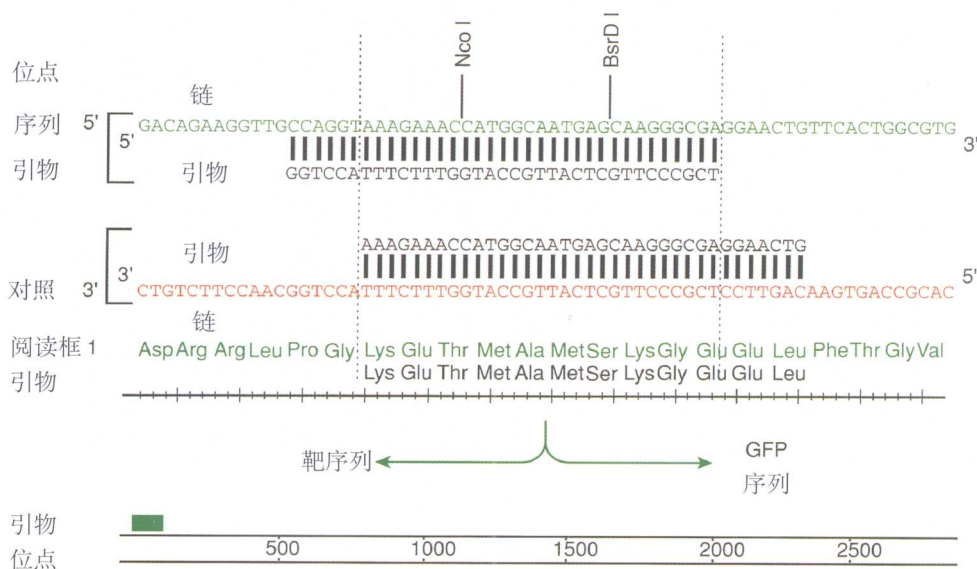
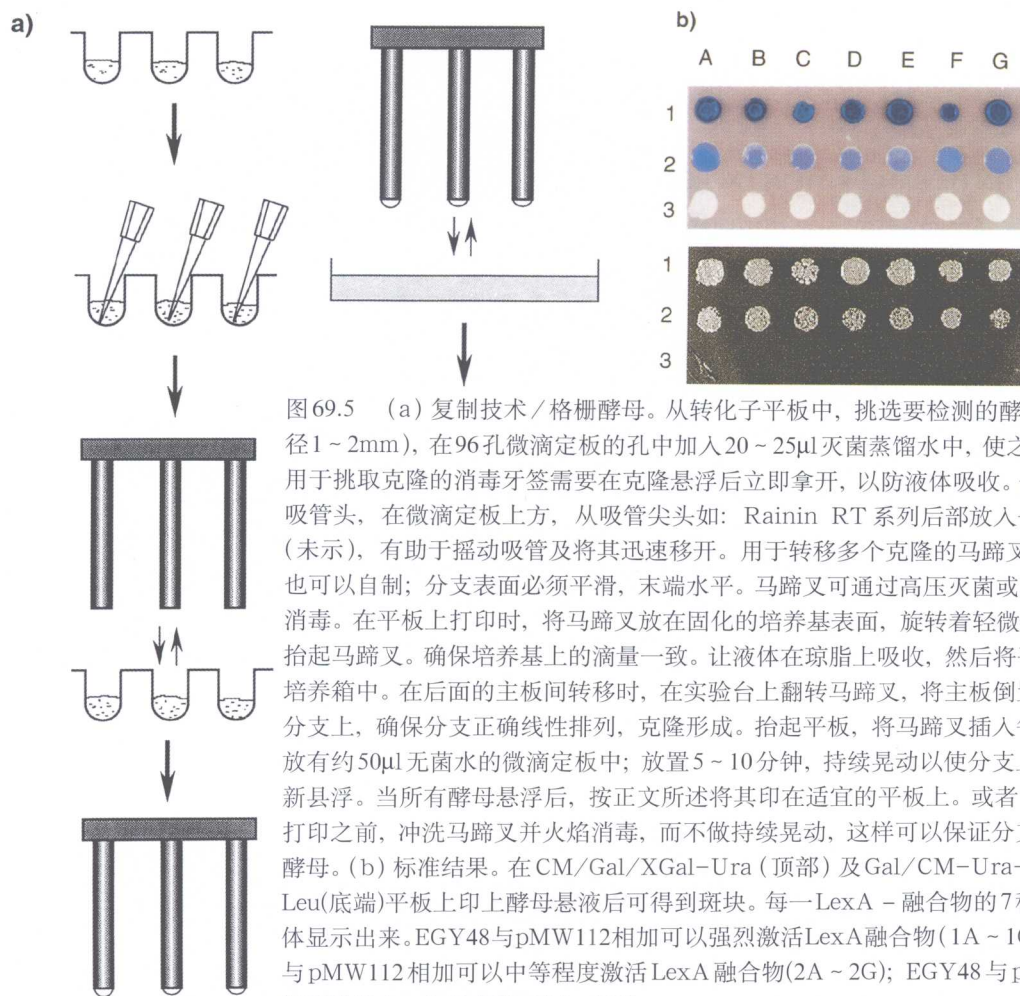


图 78.6 引物 #5。设计的引物利于 GFP 与靶蛋白的羧基端相融合

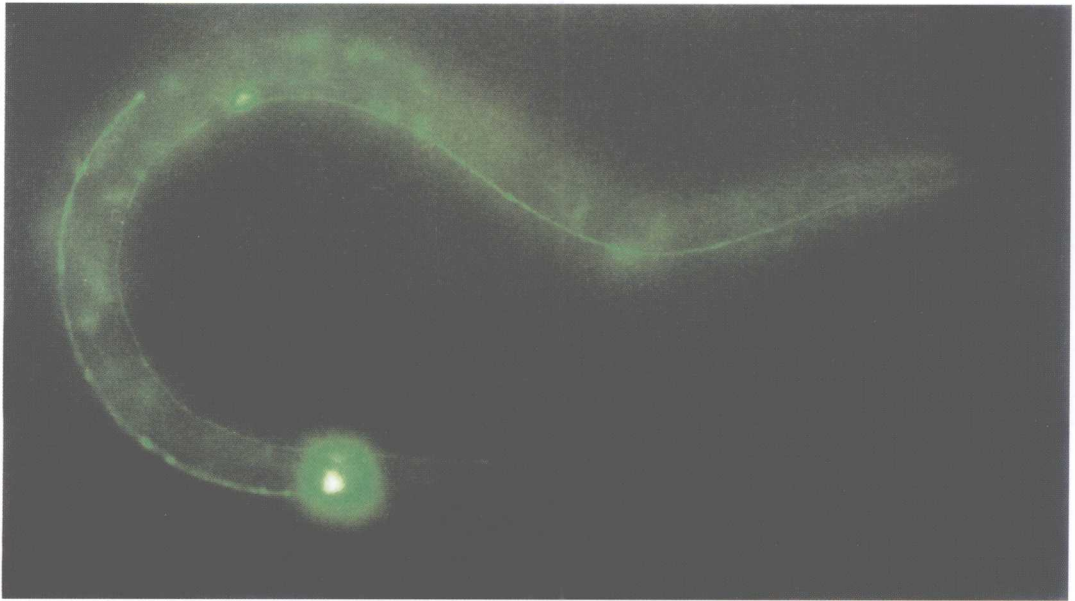


图 78.8 秀丽隐杆线虫 (*C.elegans*) *mec-7* 启动子调控的 GFP 表达。线虫 *mec-7* 基因在 6 个触觉感受器神经元中高效表达, 其他神经元中的表达水平较低。图中有两个触觉感受器神经元细胞及其一个姐妹细胞表达 GFP 荧光, 图下方荧光极强的角觉神经元细胞体, 其上方为其姐妹细胞。触觉神经元表达的荧光环使另一端的姐妹细胞比较模糊 (照片由 Department of Biological Sciences, Columbia University, New York 的 M.Chalfie 提供)

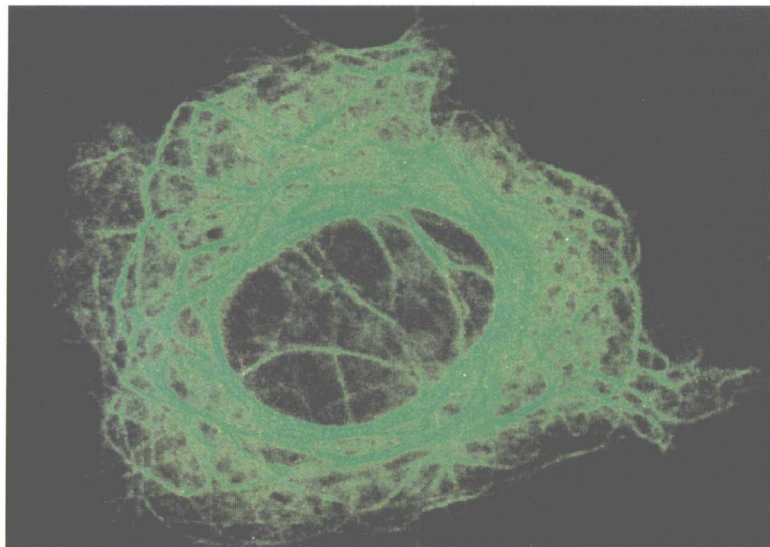


图 78.9 蜕皮激素诱导型启动子调控下 MAP4 碱性区 (BD) 与 GFP 的嵌合体转染的 3T3 活细胞共聚焦显微镜图谱。该区域微管重新组装成束 (照片由 University of Rochester 的 L.Casey, K.Olson 和 J.Olmsted 提供)

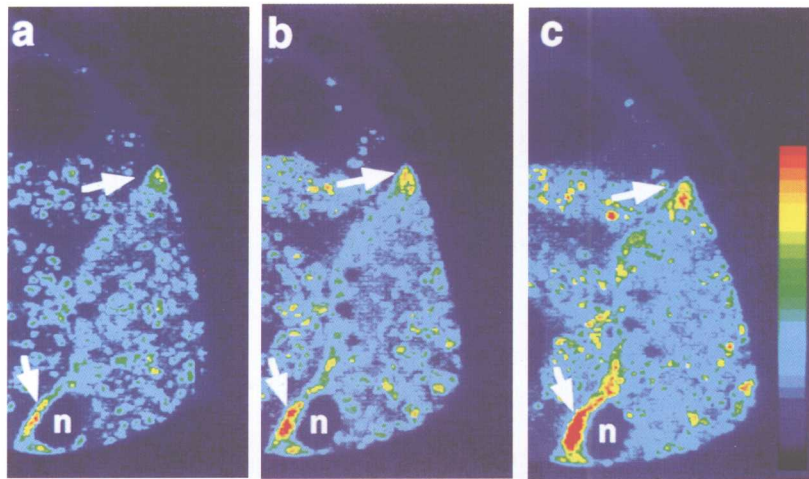


图 78.10 GFP-EXU 融合蛋白在 8 期 (stage-8) 果蝇卵腔中的定位。随着时间的延长, 荧光在前极积聚。T.Hazelrigg (Columbia University, New York) 和 B. Theurkauf (S.U.N.Y., Stony Brook, New York) 提供照片

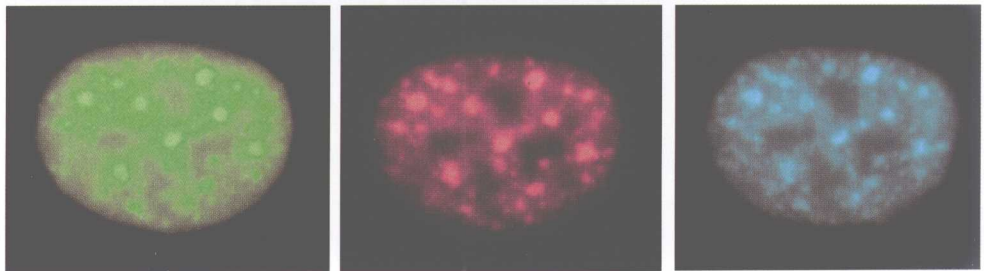


图 78.11 信使 RNA 前体剪接因子 SF2/ASF 与 GFP 羧基端符合读框融合蛋白在仓鼠幼鼠肾细胞中的表达。2 % 甲醛固定细胞后, 用得克萨斯红标记的抗小鼠二抗检测剪接因子 U2-B (红色), 用抗 - Cy5 的二抗检测 S_m 族剪接因子 (蓝色), 间接荧光显微镜下可见内源性前体剪接因子与 GFP-SF2/ASF 位于同一位置 (绿色) (冷泉港实验室 T.Misteli 提供照片)

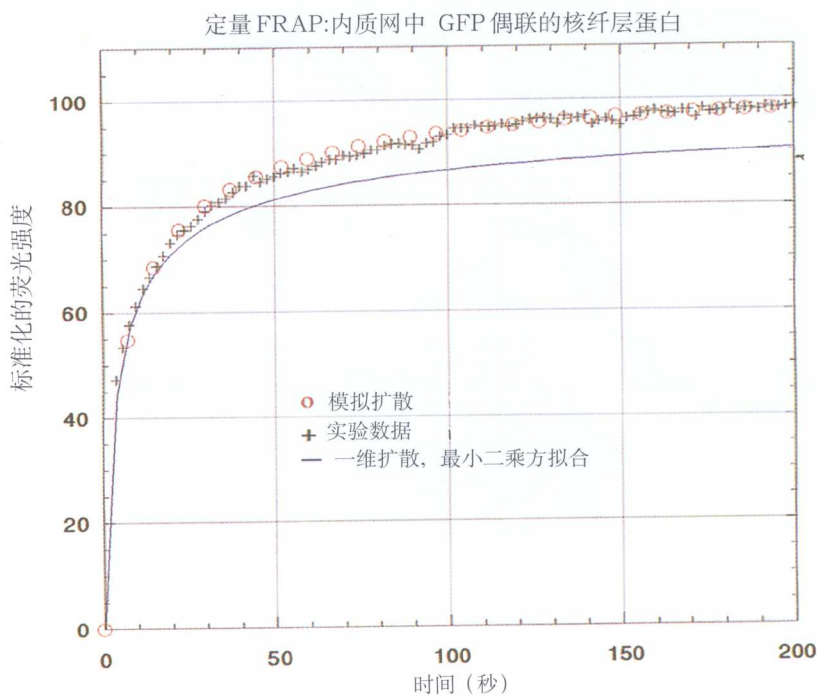


图 79.4 定量 FRAP 记录的单位面积上平均荧光强度随时间变化的曲线



图 80.1 沙元 (sand dollar) (*Echinaraenius parma*) 双细胞胚胎中一个细胞的原核膜的钙信号, 引起的钙依赖水母发光蛋白发光 (蓝色) 的定量发射区, 叠加到所注射细胞 (灰色) 的同期 DIC 显微镜图像。注射细胞的核在细胞中央, 偏离中央的大的圆球是一滴植物油, 它是作为定量正压微注射水母发光蛋白到细胞内的一个组分。背景上的细胞 (左上方) 是注射细胞的同学细胞 (前景)。此方法的详情见正文 (照片由 Woods Hole Marine 生物实验室的 R.Silver 提供)

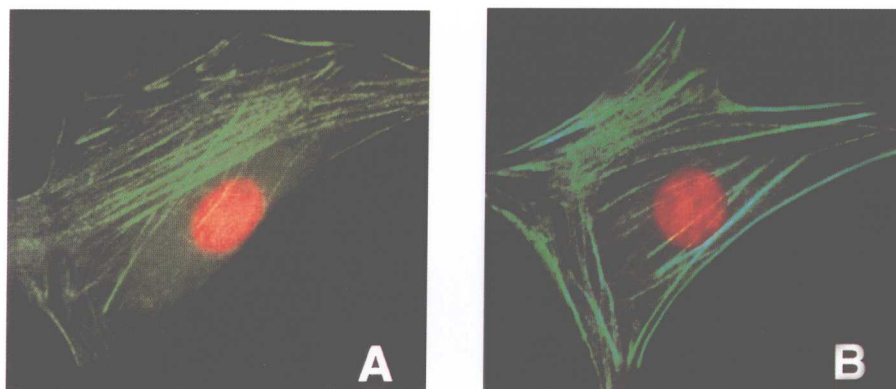


图 89.1 单细胞检测寡核苷酸的反义活性。将欲测的结合德克萨斯红的寡核苷酸 (显红色) 与有标记形式的载体一起显微注射进鼠 3T3 成纤维细胞核内, 载体编码的靶基因位用原肌球蛋白 TM-1 和对照基因肌动蛋白 TM-5 的标记示踪形式使用的抗两种不同标记示踪物的抗体, 用免疫荧光显微技术检测靶基因和对照基因的表达。刚刚表达的同位于肌动紧张纤维上的蛋白 TM-1 和 TM-5 分别显蓝色或绿色。(A) 注射与 TM-1 外显子 5' 序列互补的硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸, 显示出特异反义活性。注意, TM-1 的表达 (蓝色) 被抑制, 而对照 TM-5 的表达 (绿色) 却没有。(B) 注射互补于与 A 中寡核苷酸同样序列的磷酸二酯 2' - 氧丙基寡核苷酸。因为两种原肌球蛋白都表达了, 所以没有反义活性 (绿松石色是蓝色和绿色的交汇) (照片由冷泉港实验室 P.Lorenz 提供)

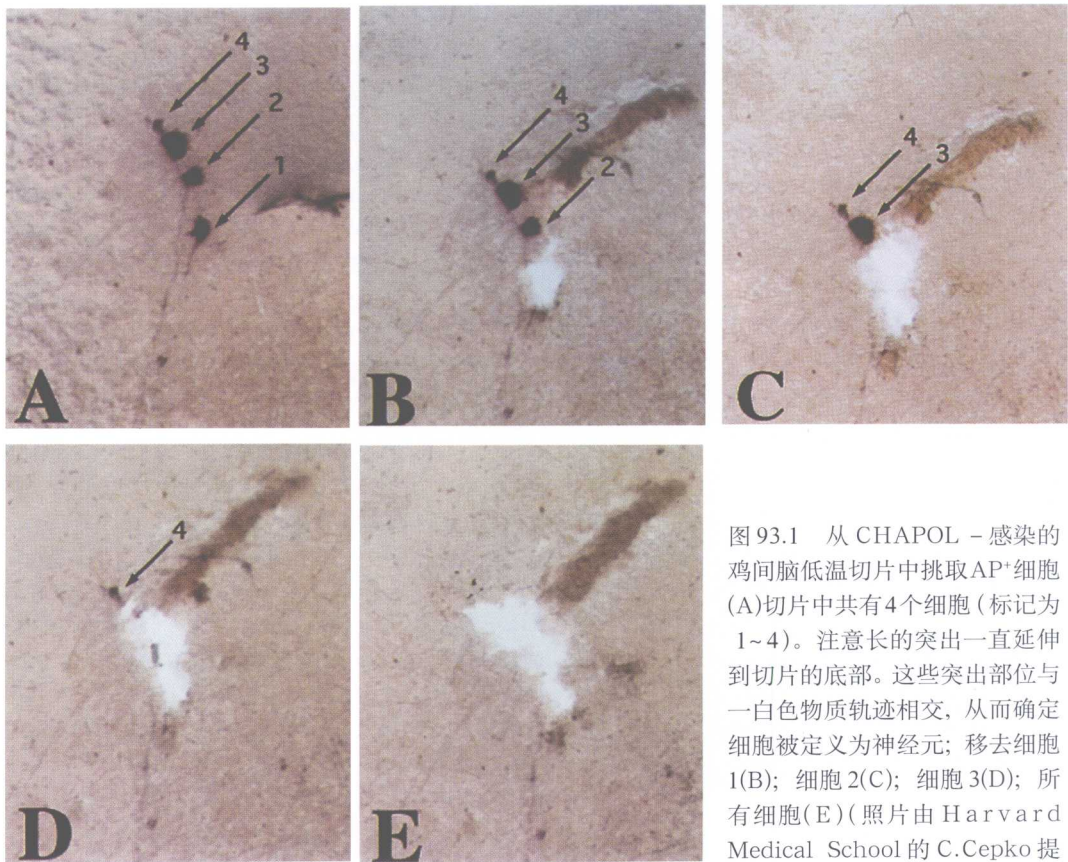


图 93.1 从 CHAPOL - 感染的鸡间脑低温切片中挑取 AP⁺ 细胞 (A) 切片中共有 4 个细胞 (标记为 1~4)。注意长的突出一直延伸到切片的底部。这些突出部位与一白色物质轨迹相交, 从而确定细胞被定义为神经元; 移去细胞 1(B); 细胞 2(C); 细胞 3(D); 所有细胞(E) (照片由 Harvard Medical School 的 C.Cepko 提供)



图 93.2 来自感染 CHAPOL 大脑及 E18 分析的间脑 60- μ m 代表性切片。移去 AP⁺ 细胞, 插入物在 PCR 后测序。发现标记 1 的 AP⁺ 细胞每个都带相同的插入物。标记 2 的两个相邻细胞带相同的插入物, 这与克隆 1 的那些细胞不同。其余 2 个细胞, 3 和 4, 在同一切片上每个带不同于 1 或 2 的独特插入物。如果除去基于几何界限的克隆定义的话, 标记 1 和 2 细胞的邻近将导致成团误差的产生。 (照片由 Harvard Medical School 的 C.Cepko 提供)

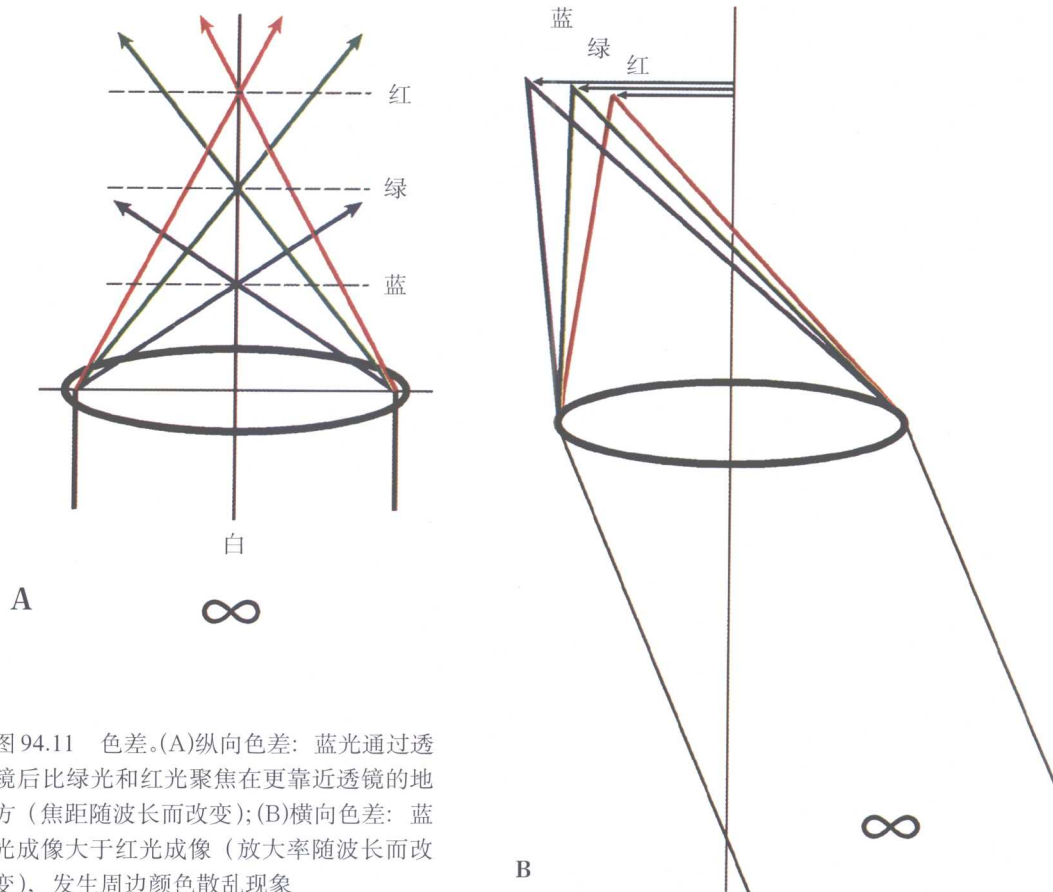


图 94.11 色差。(A)纵向色差：蓝光通过透镜后比绿光和红光聚焦在更靠近透镜的地方（焦距随波长而改变）；(B)横向色差：蓝光成像大于红光成像（放大率随波长而改变），发生周边颜色散乱现象

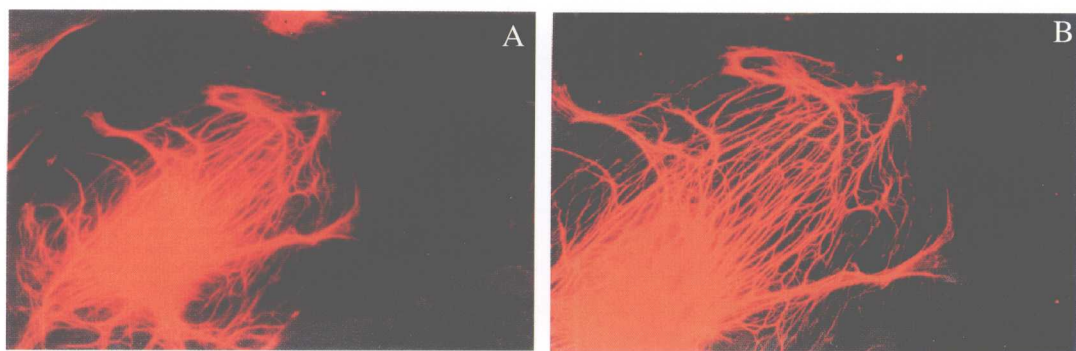


图 94.29 用角蛋白抗体标记的间接免疫荧光技术的PtK2 细胞的显微照片（见第 103 节）。在荧光显微镜下观察同一细胞的同一区域。(A)物镜为 40 $\times$ ，0.9NA 的油浸式透镜。(B)63 $\times$ ，1.4NA 油浸式透镜。该图显示了使用不同 NA 值和放大率的物镜观察纤丝状结构时分辨率的差别（照片由 Northwestern University 的 R.D.Goldman 提供）