

李荫葵 编

细胞生物学实验

Q28-73
4Y3

北京大学出版社

细胞生物学实验

李荫蓁 编

北京大学出版社

细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验
细胞生物实验

细胞生物学实验

李荫菴 编

责任编辑：李宝屏

北京大学出版社出版

(北京大学校内)

北京丰台印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经营

*

787×1092毫米 32开本5,125印张110千字

1988年7月第一版 1988年7月第一次印刷

印数：00001—4,200册

ISBN 7-301-00289-0/Q·004

定价：2.05元

出版说明

随着生物学的迅速发展，细胞生物学已成为生物学各分支学科的共同基础，也是目前各综合性大学、师范院校以及医学、农业院校有关专业的基础课程。为帮助学生掌握细胞生物学有关实验的基本原理和技术，我们根据北京大学生物系细胞生物学专业历年来的教学实践和科研中常应用的部分实验技术编写了本书。

本书比较全面而详细地介绍了细胞生物学教学和科研中最常用的实验方法。书中所述各实验均经我们在教学和科研中多次重复，证明方法可靠，简便易行。在编写时力求详尽，对有关的理论、必需的设备、操作规程等都做了必要的描述，以便于学生应用。

在本书的编写过程中，翟中和教授，高伟良同志参加过同位素部分的编写。杨澄同志写了植物细胞培养及原生质体的分离和培养，高伟良同志还写了细胞融合，王河同志编写了组织培养细胞线粒体的提取，马莱龄同志为本实验写了细胞培养的方法。最后，翟中和教授对全书进行了审阅。对于他们的帮助我们深表谢意。

由于我们的水平有限，书中难免有错误或不妥之处，欢迎读者批评指正。

编 者

目 录

第一部分 显微镜与显微标本制作	(1)
实验一 显微镜.....	(1)
实验二 细胞形态及其大小的测量.....	(16)
实验三 显微标本制作的一般原理及步骤.....	(20)
第二部分 细胞器及细胞组分的分离	(31)
实验四 细胞器.....	(31)
实验五 线粒体的提取与观察.....	(41)
第三部分 细胞化学	(48)
实验六 核酸 (DNA及RNA) 的显示法.....	(48)
实验七 多糖的显示——过碘酸席夫反应 (PAS反应).....	(60)
实验八 碱性蛋白与总体蛋白的定位.....	(63)
实验九 酶的显示——酸性磷酸酶.....	(66)
第四部分 细胞膜的透性与细胞外衣	(71)
实验十 膜的透性.....	(71)
实验十一 细胞外衣.....	(75)
第五部分 细胞培养	(78)
实验十二 动物细胞培养.....	(79)
实验十三 体外培养细胞的观察.....	(89)
实验十四 动物细胞融合.....	(94)
实验十五 植物细胞培养.....	(98)
实验十六 植物原生质体的分离和培养.....	(101)

第六部分 显微放射自显影技术及细胞内

DNA与RNA合成的标记…………… (105)

实验十七 显微放射自显影样品的制备及

观察…………… (105)

第七部分 细胞分裂及细胞分裂的同步化诱导…………… (125)

实验十八 细胞分裂及染色体标本制作…………… (125)

实验十九 动物细胞染色体标本制作…………… (131)

实验二十 热休克法诱导四膜虫的同步

分裂…………… (134)

附录…………… (138)

一、几种常用固定剂的配制及应用…………… (138)

二、几种常用染料的配制法…………… (139)

三、几种常用染色剂的用途…………… (142)

四、常用于各种动物的生理盐水…………… (143)

五、常用缓冲盐液的配制…………… (143)

六、测定酸碱度常用的几种指示剂…………… (144)

七、细胞培养用溶液的配制…………… (145)

八、常用缓冲溶液的配制…………… (151)

九、载玻片的洗涤方法…………… (153)

十、常用的粘贴剂及封固剂…………… (154)

十一、D-19^b显影液和F-5定影液的

配制…………… (155)

主要参考资料…………… (157)

图版…………… (159)

第一部分 显微镜与显微标本制作

实验一 显微镜

“工欲善其事，必先利其器”。细胞的发现以及细胞学说的建立，均与显微镜的发明和不断地改进有密切关系。从最早观察原生动物的雷文虎克到今天应用荧光显微镜、干涉显微镜所进行的研究，虽然在显示细胞的结构方面有了很大的改进，但显微镜仍然是对于生命的基本结构的研究工具。当然雷文虎克所用的显微镜是简单显微镜，它是由一个作为放大的透镜玻璃所构成的。为了获得较大的放大倍数及较好的效果，改用了两组透镜系统，组成复式显微镜。

对于显微镜的构造及成像原理，在此不再详述。本实验重点对如何正确使用显微镜及如何充分发挥显微镜性能方面作一些简要的介绍。

一、目的与要求

通过显微镜使用的练习，进一步学习及掌握怎样合理使用显微镜及正确判断显微镜性能的标准。

二、原理

(一) 显微镜的基本结构

1. 显微镜的组成

显微镜的结构可以分为三部分：一、光学部分，包括目

镜和物镜，用以放大物像。二、集光系统，由反射镜、聚光器、光源等组成显微镜的照明系统；聚光器将反射镜反射来的光线集中并照射在被观察的物体上。三、机械部分，包括镜头转换器、配焦器、载物台、执手、镜座等几部分。

2. 显微镜的成像原理

显微镜为什么能把物体放大？显微镜的光学部分就是以放大物像，光学部分主要由物镜和目镜组成。它们都是凸透镜。根据凸透镜的成像原理（见图1），若将被测物体置于物镜的1—2倍焦距之间，则经过物镜后形成一个放大的倒立实像，此像恰好位于目镜的焦距之内。再通过目镜放大后形成一个放大的虚像。由虚像所现之光，通过人眼球的水晶体，在视网膜上呈现的像是实像。于是人的眼球就成为显微镜系统中的一个组成部分了。

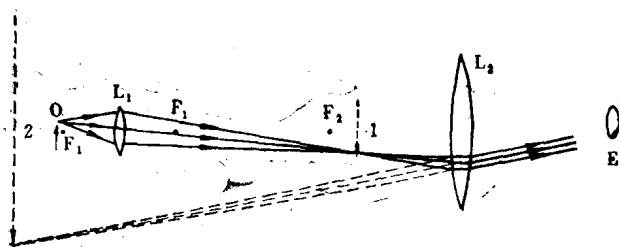


图1 复式显微镜的光路图

L_1 ，物镜； L_2 ，目镜； F_1 ，物镜焦点； F_2 ，目镜焦点；1，实像；2，虚像；O，物体；E，眼睛。

（二）显微镜的性能

显微镜的性能主要包括分辨率、放大率、焦点深度及镜像亮度等等。但是各因素之间也是互相影响的。现分别简述如下

1. 分辨率 (resolving power) (鉴别率) 或称分辨本领

分辨率是指能把两点或两条线分开的最小距离的能力。两点或两条线之间的距离越小,则分辨力也越高。如人眼的分辨率平均约为 $1/10\text{mm}$ 或 $100\mu\text{m}$,也就是说,如果两条平行线之间的距离小于 $100\mu\text{m}$,在人眼中,这两条线就变成一条了。

光学显微镜既有放大的能力,又有比人眼高得多的分辨能力。现在最好的光学显微镜的分辨能力可达 $0.2\mu\text{m}$,这就是说,光学显微镜比人眼的分辨能力提高了500倍。显微镜的分辨力是与照明光的波长和物镜的开口率有关,可用下列公式表示:

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

式中, d 为分辨距离, λ 为照明光的波长, NA 为物镜的开口率。从上式可以看出,照明光的波长越短,物镜的开口率越大,分辨距离就越小,分辨能力则越高。

所以人们为提高显微镜的分辨力,采用短波长的光源作为照明,如紫外光显微镜,它可以将普通光照明的显微镜的分辨能力提高一倍。又如电子显微镜,用高速电子束作为照明的光源,波长可短到 0.005nm 。目前电镜的分辨能力可达到 0.2nm ($2\text{\AA}$) 左右,它比光学显微镜的分辨能力又提高1000倍以上。

2. 放大率 (放大倍数)

显微镜的优劣标准之一是镜头的分辨率。人眼在观察物体时,也有一定的分辨率。因此在观察物体时,对显微镜放大倍数的选择,也有一定的限度,不是放大倍数越大越

好。

显微镜适合的放大倍数决定于物镜的数值孔径，一般应为 NA 的500—1000倍。可用下式表示：

$$M(\text{放大倍数}) = NA \times (500-1000)$$

放的倍数过大，并不能增加标本的细微程度。所以在选择放大倍数时要考虑与目镜的匹配。在目镜与物镜的组合中，目镜有效的最大倍数。可按下式表示：

$$M = \text{目镜倍数}(O) \times \text{物镜倍数}(B)$$

$$O \times B = NA \times (500-1000)$$

$$O = \frac{NA \times (500-1000)}{B}$$

所以在选择放大倍数时，一定要注意镜头的匹配，否则会影响物像的清晰度。

3. 清晰度

清晰度指的是造成轮廓清晰的物像的能力而言，它主要与物镜性能有关。

4. 焦点深度

当焦点与某一物点一致时，不仅是这一物点，就连它的上下两侧也能看得清楚，这种清晰部分的厚度就叫做焦点深度。如焦点深，就能看到被检物体的全部层次，这样便于观察。但焦点深度与物镜开口率和显微镜的总放大率成反比，所以在使用高倍物镜时，必须灵活地运用调焦部分，从上到下地观察被检物体的全层。

5. 镜像亮度

镜像亮度与开口率的平方成正比，而与显微镜的总放大率的平方成反比。镜像当然是越亮越好，如果其他条件相同，开口率越大镜像越亮，但要注意与目镜的适当匹配。

镜像亮度和视野亮度不同，后者不仅与物镜和目镜有关，而且还与聚光镜、光栏、反光镜和光源有关。

(三) 显微镜的照明

显微镜的照明有各种不同的分类方法，通常根据光线来源的方向可分为透射照明和落射照明两大类。而透射照明又可分为中心照明和斜射照明。

照明的方法决定于光源和显微镜本身的照明装置。

三、实验内容

1. 显微镜的合轴调节。
2. 显微测量。
3. 介绍几种特殊显微镜，重点了解它们的应用价值。

四、实验步骤

(一) 克勒照明法的调节练习

1. 首先将工作台清理干净，接通电源，开启显微镜电源开关。
2. 将欲观察的标本放在载物台上，用压片夹压好。
3. 提高聚光器。
4. 在低倍的情况下，调节焦距，至物像清晰为止。
5. 缩小视野光栏（靠近灯的红彩部分），可以看到不清晰的视野光栏，此时若微降聚光器就可看到光栏图像逐渐清晰，呈多边形的环。
6. 此时可不断地开闭视野光栏，使多边形的周边与视野周边相近，此时可取下物镜从镜筒可以看到孔径光栏，使它达到物镜后透镜直径的 $2/3$ 。
7. 微上升聚光器，使其恢复到原位置即可。因为视野

光栏的成像在物体的标本处，否则会影响标本的清晰度。

如果视野光栏与孔径光栏不同心，此时就要调节聚光器的位置使达到两光栏的图像同心即可，否则会影响照明的效果。

以上的步骤可反复练习，同时可体会光路的成像部位。

(二) 显微测量——细胞大小的测量 (步骤及要求见实验二)

(三) 几种特殊功能的显微镜

普通显微镜由于受照明波长的限制，对观察的标本就有一定的局限性，如对活细胞的观察，细胞的物质结构的变化及内含物的分析等等就有一定的困难。以后通过不断地研制生产出适应于各种需要的特殊功能的显微镜如观察生活细胞的内部结构的相差显微镜，对组成细胞内成分的分子排列分析的偏振光显微镜及观察细胞内化学组分的荧光显微镜等等。我们重点介绍相差显微镜的原理及其使用，其他几种仅简要的介绍一下。

相差显微镜

我们的眼睛，对光的波长是不敏感的，只有在光波的波长（颜色）和振幅（亮度）有变化时才能看到被检物体。但活的生物体多为无色透明。当光波通过这种物体时，波长和振幅并不发生变化，于是，用普通显微镜很难观察。为了要看到细胞内的结构，一般都要将材料经过处理，即要经过固定及染色的过程，使被观察的标本颜色及亮度发生了变化，方能看到。或者不经染色，也可缩小显微镜的孔径光栏加强明暗的对比，但这种方法不能充分利用镜口率，而且视野亮度也要减弱，因而对细微结构也很难辨别。

相差显微镜就能解决上述困难，它主要是利用被观察物

体的光程之差进行镜检的方法。光程 = 折射率 × 物体的厚度，如果被观察的物体与介质之间，或该物体的各部分的折射率或厚度不同，即使是无色的透明体，也能分辨出它的细微结构。

1. 原理

在了解相差显微镜的原理之前，首先必须了解光波的各种特性以及光波通过物体时这些特性发生了什么变化，在什么情况下我们能够观察到。

(1) 相差：光波通过均匀物体的状态与池塘水面的波纹相似，当遇到阻力时，它的波动就要改变(图2)。光波在通过物体时，会产生相位的变化。所谓相位是指在某一时间内，光的波动所能达到的位置。但这种相位是可变的，当一束光线通过不同的介质后，其相位会发生变化。变化的结果使相位间产生了差异。这种在相位上产生的差异即为相差。

我们的眼睛对相位的变化是不敏感的，只有在把相位之

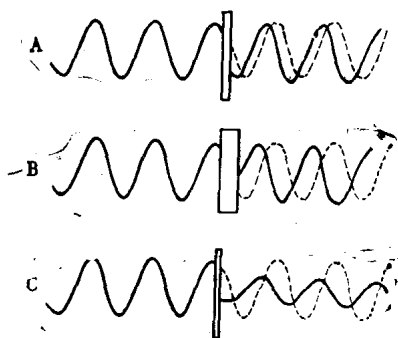


图2 通过不同介质后光波的变化

A. 通过高折射率的介质时，对光波的影响；B. 介质与A相同，但厚度加大时，光波的变化；C. 通过介质，光被吸收后，光波的变化。

差变为振幅（明暗）之差时，才能为人们所分辨。所以相差决定于光波所通过的介质的折射率与厚度之差，标本越厚或介质折射率越大，则光波减速也越大。

（2）衍射与干涉：光的另一特性就是衍射与干涉。当观察物体时光波通过小颗粒的物体后，会产生直射光和衍射光。在光学系统中，直射光与衍射光相遇（得到光的叠加）导致光的振幅发生变化，呈现出明或暗的差别。

如果把通过小颗粒物体的光速推迟 $1/4$ 波长（见图3）使直射光与衍射光保持同一相位，它的合成波等于直射波与衍射波的振幅之和，小颗粒的像呈明亮。相反，如若把衍射光速度推迟 $1/4$ （见图4），衍射光与直射光的相差变成 $1/2$ 波

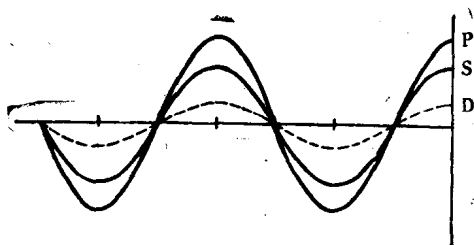


图3 把直射光S推迟 $1/4$ 波长，与衍射光D的相位一致，二种光通过物体形成的合成波（P）的振幅比背景（S）的振幅大。

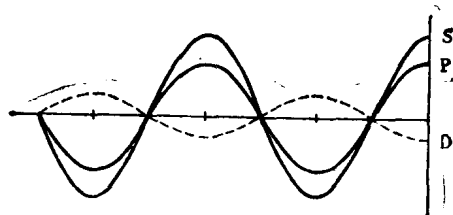


图4 把衍射光推迟 $1/4$ 波长，它与直射光之间相差 $1/2$ 波长时，合成波（P）的振幅比S的振幅小。

长，它的合成波等于两波的振幅之差，此时小颗粒的像点比背景暗。

(3) 相板的作用：通常用光学玻璃制成的相板作为相膜。相板由二部分组成：一是直射光通过的部分，叫共轭面，为环状；另一部分是绕过衍射光的部分，称为补偿面，位于共轭面的两侧，它对光波起到阻滞的作用。当光线通过物体，利用相板把相位推迟 $1/4$ 波长时，最后形成的像与背景明暗之差为最大，如图5所示。

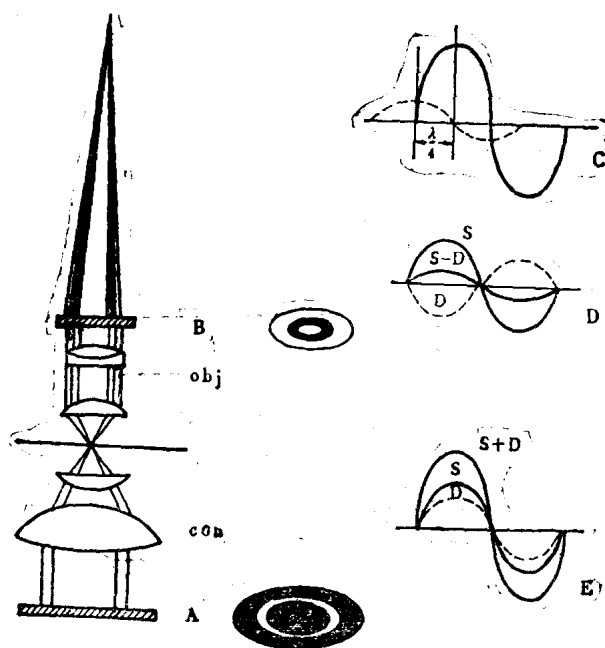


图5 相差显微镜的原理

A. 聚光器下面的光环；B. 在物镜中相应的相板；
C. 观察时的光波；D. 光束通过物镜相板后的光波；E.
光束通过聚光器光环后的光波；con, 聚光器；obj, 物镜。

根据上述原理所制成的显微镜与普通显微镜的不同之处，是在聚光器的下面装有环状光栏，物镜后焦面处装有相板。它们的作用效果见相差显微镜的光路图（图5）。

利用相板，把光波的相位推迟从而改变光的振幅。相板的作用，除推迟直射光和衍射光的相位之外，还有吸收光的能力，从而有改变亮度的作用。

相板的种类较多，根据对光的吸收率高低的不同，可分为明反差及暗反差两种。a. 明反差（bright contrast）或负反差（negative contrast）是指在相差显微镜的视野中，物像亮度大于背景亮度。b. 暗反差（dark contrast）或正反差（positive contrast）是指在相差显微镜的视野中，背景亮度大于物像亮度的现象。

2. 相差显微镜的装置

相差显微镜不可缺少的附件有环状光栏和相板。环状光栏多与聚光镜组合在一起组成转盘聚光镜，相板多装在物镜

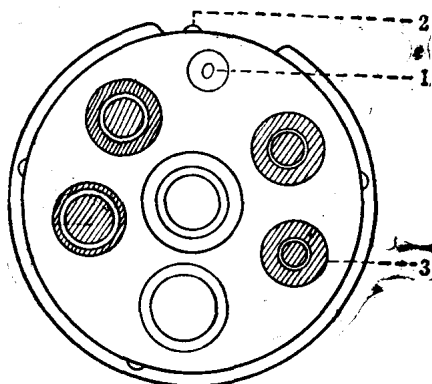


图6 转盘聚光器的内部结构

1. 示标孔，如“0”时；2. 旋转转盘用的把手；3. 对应不同放大倍数物镜的环状光栏孔。

中而组成相差物镜。另外还有合轴调整用望远镜及绿色滤光片。

(1) 环状光栏：具有环状光栏的转盘聚光镜内装有大小不等的环状孔的光栏，在圆盘上刻有代表不同物镜倍数的号数（如40x，20x等）。更换不同放大倍数的物镜时，同时要更换代表环大小的号数，如物镜是40x，则环状光栏就要选择40，否则环的直径与孔宽就不相适应。

(2) 相板：相板安装在物镜的后焦面处，物镜的后焦点位于透镜中间，所以相板安装在透镜中间，有这种装置的物镜称为相差物镜，在镜头的上面标有Ph，或NH，PL等标记。

(3) 合轴调整望远镜：为使相差达到应有的效果，必须使环状光栏的中心与物镜光轴完全在一条直线上。在设计时已经使光栏的大小与物镜的放大倍数相适应，但实际上免不了有点误差，表现为环状光栏在物镜后焦面所造成的像（亮环）常常与相板的圆环不一致。一般情况下，当取走目镜后从镜筒也能看到此两环的图像，但这种差别极小，所以把工作距离长的低倍望远镜安装在镜筒上以放大图像，这种镜头称为合轴调整望远镜，一般在镜头的外边标有Ph或CT标记。

3. 相差显微镜的合轴操作步骤

首先接通电源，然后将被检样品放于载物台上，选用明视野聚光器，进行调焦，光路合轴。

(1) 克勒照明法调节光及合轴（详见实验步骤(一)）：按前述的方法将光及合轴调整好，即可进行相差显微镜的调节。

(2) 合轴调整：合轴调整的具体方法如下：从低倍开