



细胞生物学 实验与探究

张红锋◇编著

细胞计数和存活率测定

细胞原代培养和传代培养

细胞膜通透性的测定

叶绿体提取和希尔反应活性检测

线粒体琥珀酸脱氢酶活性检测

植物细胞骨架的光学显微镜观察

外周血淋巴细胞的染色体制片

细胞凋亡的诱导和

自主设计性探究实验

细胞生物学实验报告

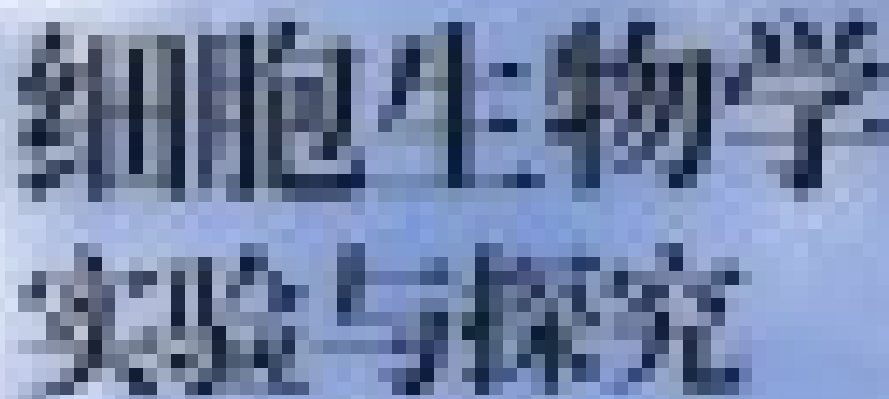
.....



上海市
著名商
标市

华东师范大学出版社

全国百佳图书出版单位



1. **Introduction**
 2. **Background**
 3. **Methodology**
 4. **Results**
 5. **Discussion**
 6. **Conclusion**
 7. **References**
 8. **Appendix**
 9. **Figure 1**
 10. **Figure 2**
 11. **Figure 3**
 12. **Figure 4**
 13. **Figure 5**
 14. **Figure 6**
 15. **Figure 7**
 16. **Figure 8**
 17. **Figure 9**
 18. **Figure 10**
 19. **Figure 11**
 20. **Figure 12**
 21. **Figure 13**
 22. **Figure 14**
 23. **Figure 15**
 24. **Figure 16**
 25. **Figure 17**
 26. **Figure 18**
 27. **Figure 19**
 28. **Figure 20**
 29. **Figure 21**
 30. **Figure 22**
 31. **Figure 23**
 32. **Figure 24**
 33. **Figure 25**
 34. **Figure 26**
 35. **Figure 27**
 36. **Figure 28**
 37. **Figure 29**
 38. **Figure 30**
 39. **Figure 31**
 40. **Figure 32**
 41. **Figure 33**
 42. **Figure 34**
 43. **Figure 35**
 44. **Figure 36**
 45. **Figure 37**
 46. **Figure 38**
 47. **Figure 39**
 48. **Figure 40**
 49. **Figure 41**
 50. **Figure 42**
 51. **Figure 43**
 52. **Figure 44**
 53. **Figure 45**
 54. **Figure 46**
 55. **Figure 47**
 56. **Figure 48**
 57. **Figure 49**
 58. **Figure 50**
 59. **Figure 51**
 60. **Figure 52**
 61. **Figure 53**
 62. **Figure 54**
 63. **Figure 55**
 64. **Figure 56**
 65. **Figure 57**
 66. **Figure 58**
 67. **Figure 59**
 68. **Figure 60**
 69. **Figure 61**
 70. **Figure 62**
 71. **Figure 63**
 72. **Figure 64**
 73. **Figure 65**
 74. **Figure 66**
 75. **Figure 67**
 76. **Figure 68**
 77. **Figure 69**
 78. **Figure 70**
 79. **Figure 71**
 80. **Figure 72**
 81. **Figure 73**
 82. **Figure 74**
 83. **Figure 75**
 84. **Figure 76**
 85. **Figure 77**
 86. **Figure 78**
 87. **Figure 79**
 88. **Figure 80**
 89. **Figure 81**
 90. **Figure 82**
 91. **Figure 83**
 92. **Figure 84**
 93. **Figure 85**
 94. **Figure 86**
 95. **Figure 87**
 96. **Figure 88**
 97. **Figure 89**
 98. **Figure 90**
 99. **Figure 91**
 100. **Figure 92**
 101. **Figure 93**
 102. **Figure 94**
 103. **Figure 95**
 104. **Figure 96**
 105. **Figure 97**
 106. **Figure 98**
 107. **Figure 99**
 108. **Figure 100**
 109. **Figure 101**
 110. **Figure 102**
 111. **Figure 103**
 112. **Figure 104**
 113. **Figure 105**
 114. **Figure 106**
 115. **Figure 107**
 116. **Figure 108**
 117. **Figure 109**
 118. **Figure 110**
 119. **Figure 111**
 120. **Figure 112**
 121. **Figure 113**
 122. **Figure 114**
 123. **Figure 115**
 124. **Figure 116**
 125. **Figure 117**
 126. **Figure 118**
 127. **Figure 119**
 128. **Figure 120**
 129. **Figure 121**
 130. **Figure 122**
 131. **Figure 123**
 132. **Figure 124**
 133. **Figure 125**
 134. **Figure 126**
 135. **Figure 127**
 136. **Figure 128**
 137. **Figure 129**
 138. **Figure 130**
 139. **Figure 131**
 140. **Figure 132**
 141. **Figure 133**
 142. **Figure 134**
 143. **Figure 135**
 144. **Figure 136**
 145. **Figure 137**
 146. **Figure 138**
 147. **Figure 139**
 148. **Figure 140**
 149. **Figure 141**
 150. **Figure 142**
 151. **Figure 143**
 152. **Figure 144**
 153. **Figure 145**
 154. **Figure 146**
 155. **Figure 147**
 156. **Figure 148**
 157. **Figure 149**
 158. **Figure 150**
 159. **Figure 151**
 160. **Figure 152**
 161. **Figure 153**
 162. **Figure 154**
 163. **Figure 155**
 164. **Figure 156**
 165. **Figure 157**
 166. **Figure 158**
 167. **Figure 159**
 168. **Figure 160**
 169. **Figure 161**
 170. **Figure 162**
 171. **Figure 163**
 172. **Figure 164**
 173. **Figure 165**
 174. **Figure 166**
 175. **Figure 167**
 176. **Figure 168**
 177. **Figure 169**
 178. **Figure 170**
 179. **Figure 171**
 180. **Figure 172**
 181. **Figure 173**
 182. **Figure 174**
 183. **Figure 175**
 184. **Figure 176**
 185. **Figure 177**
 186. **Figure 178**
 187. **Figure 179**
 188. **Figure 180**
 189. **Figure 181**
 190. **Figure 182**
 191. **Figure 183**
 192. **Figure 184**
 193. **Figure 185**
 194. **Figure 186**
 195. **Figure 187**
 196. **Figure 188**
 197. **Figure 189**
 198. **Figure 190**
 199. **Figure 191**
 200. **Figure 192**
 201. **Figure 193**
 202. **Figure 194**
 203. **Figure 195**
 204. **Figure 196**
 205. **Figure 197**
 206. **Figure 198**
 207. **Figure 199**
 208. **Figure 200**
 209. **Figure 201**
 210. **Figure 202**
 211. **Figure 203**
 212. **Figure 204**
 213. **Figure 205**
 214. **Figure 206**
 215. **Figure 207**
 216. **Figure 208**
 217. **Figure 209**





细胞生物学实验与探究

张红锋◇编著



华东师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验与探究 / 张红锋编著. —上海: 华东师范大学出版社, 2011. 11
华东师范大学教材出版基金
ISBN 978 - 7 - 5617 - 9057 - 1

I. ①细… II. ①张… III. ①细胞生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q2 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 227774 号

华东师范大学教材出版基金资助出版

细胞生物学实验与探究

编 著 张红锋
组稿编辑 孔繁荣
项目编辑 宋坚之
审读编辑 顾福康 陈俊学
责任校对 陈俊学
装帧设计 卢晓红

出版发行 华东师范大学出版社
社 址 上海市中山北路 3663 号 邮编 200062
网 址 www.ecnupress.com.cn
电 话 021 - 60821666 行政传真 021 - 62572105
客服电话 021 - 62865537 门市(邮购)电话 021 - 62869887
地 址 上海市中山北路 3663 号华东师范大学校内先锋路口
网 店 <http://hdsdcbs.tmall.com>

印 刷 者 上海崇明裕安印刷厂
开 本 787 × 1092 16 开
印 张 13
字 数 242 千字
版 次 2012 年 2 月第 1 版
印 次 2012 年 2 月第 1 次
书 号 ISBN 978 - 7 - 5617 - 9057 - 1/Q · 026
定 价 38.00 元

出 版 人 朱杰人

(如发现本版图书有印订质量问题, 请寄回本社客服中心调换或电话 021 - 62865537 联系)

导 言

细胞是生命活动的基本单位,也是生命科学研究的重要对象。目前基于细胞结构和功能的研究是生命科学和医学研究的重要组成部分,细胞生物学实验技术已经成为生命科学相关专业本科生和研究生从事科学研究的必备技能。因此,细胞生物学及其实验是高等院校的基础主干课程,在教学中具有十分重要的地位和作用。

在多年的细胞生物学实验教学中,我们深切地体会到,实验课不应该只是技术课和实验操作课,而更应该是科学研究的方法学课和探究课;学生不应该只是看着实验教材,听着教师的指导按部就班的实验操作员,而更应该是带着自己的问题和设想,主动地去探究和寻找问题答案的研究者。因为科学研究都是源自于问题的提出,通过设计实验、实施实验和分析数据来寻找问题的答案。所以,学生应该带着问题走进生命科学实验室。通常,学生在实验课上主要进行实验原理的学习和实验操作的训练,在完成实验报告的过程中学习如何整理和分析实验结果,但缺少实验设计这一环节的学习和锻炼。可以说,学生所经历的实验过程并不是一个完整的科学研究过程,他们没有提出问题,也缺乏为解答问题而设计实验的真正体验。为了适应创新人才培养的需要,本书在实验教学模式和教学内容上作了大胆的尝试,主要体现在以下几个方面:

1. 教材中每一个实验的书面呈现体系分别为问题,实验方案,背景知识,对教师的教学建议,对学生的学习要求,实验材料、器材和试剂,实验步骤,作业,探究实验小建议,阅读资料,实验报告,附录等。

首先由“问题”引出实验内容,接着概括出针对问题而设计的“实验方案”,然后通过详细的“背景知识”让学生学习实验原理和方法,在实施“实验步骤”的过程中要求学生将原始数据记录在教材上的表格中,“阅读”每个实验内容相关的研究论文,最后完成实验报告上的“作业”。

2. 实验内容包括基础性实验和自主设计性探究实验两部分。前 10 个实验为基础性实验,包括细胞计数和显微测量技术、细胞培养技术、细胞组分的分离纯化技术、细胞化学和酶活性检测技术,细胞膜生理以及细胞凋亡检测技术等。第 11 个实验是自主设计性探究实验,要求学生应用基础实验中已掌握的一种或几种方

法,或者自学新的实验方法,对一个自己感兴趣的问题进行科学探究。探究实验完全以学生为主体,由学生自主选题,自己准备实验材料和配制试剂,以小组为单位独立完成实验,并进行科研论文的写作和演讲报告,让学生真正体验一次科学研究的全过程。为了帮助学生自主选题,每个基础性实验中均设立了“探究实验小建议”和“附录”,以供学生参考学习。

自主设计性探究实验的目的在于强调实验技术的综合运用,培养学生的创新意识、分析问题和解决问题的能力,因为创新需要牢固的基础,所以,探究实验必须建立在基础性实验的基础之上,只有充分发挥基础性实验的示范作用,才能在探究实验中取得突破性的收获。

3. 教材包含原始数据记录和实验报告,使实验记录和数据处理更加规范化,实验报告(含作业题)为活页形式可以依次提交给老师。学生还要完成2篇科研论文的写作,并进行一次演讲交流,培养书面和口头表达能力。

4. 阅读资料均为应用实验教材上的方法所进行的科学研究并已发表的论文,目的在于使学生充分体会和理解实验技术在科学研究中的重要作用,也是学生在探究实验中进行自主选题的参考范本,同时还有助于学生学习科学规范的实验设计和论文写作。

5. 实验报告中的自评,要求学生给自己的实验操作打分,可以及时发现弱点并不断完善实验技能,促使学生通过自我评价不断进步。

6. 附录包括实验仪器的工作原理和使用方法,与实验教学内容相关的拓展性实验,生物统计学方法,科研论文写作格式和要求,学生探究实验论文范本,以及学术报告的PPT要求和演讲技巧等,可供教师在教学中选用,也可供学生在自主设计性探究实验中学习和参考。

7. 教学建议可以帮助教师在组织教学活动时充分体现以学生为主体,以“问题和研究”为主线的教学理念,使科学研究方法、科学思维方式、创新意识、科学态度和科学精神的培养在实验教学中得以实现。

本书是多年来细胞生物学实验教学改革结晶,虽然所选择的基础性实验内容并不一定是最新的实验技术,但每个实验都是综合了多种实验方法的研究案例,在科学思维的逻辑性、实验设计的科学性、数据分析的合理性等方面起到一定的示范作用。它既是本科生的实验指导书,又是教师的教学指导书,对提高本科实验教学质量将会起到一定的推动作用。

本书在编写过程中得到上海市教委重点课程项目、华东师范大学主干课程建设基金和华东师范大学教材出版基金资助,在此表示感谢。本书也是细胞生物学实验教学团队共同努力的结果,任华、尹蔚翰和孙剑华老师不仅在实验教学过程中进行了创新性的探索和尝试,而且积极参与了教材的编写工

作。但由于我们能力所限,本书尚有很多不尽如人意之处,我们恳切地希望得到广大读者的宝贵意见,使这本书能更适合当前实验教学改革的需要。

张红锋

2011年10月20日

目 录

导言 / 1

实验一 收集动物组织的活细胞并计数和测定细胞存活率 / 1

- 附录：一、实验动物(小鼠)的抓取和处死方法 / 7
- 二、普通光学显微镜的基本构造和使用方法 / 8
- 三、暗视野显微镜的基本构造和使用方法 / 12

实验二 细胞培养前的准备 / 21

- 附录：一、倒置相差显微镜的基本构造和使用方法 / 28
- 二、高压蒸汽灭菌锅的工作原理和使用方法 / 30
- 三、超净工作台的工作原理和使用方法 / 31

实验三 乳鼠肾细胞原代培养 / 33

实验四 细胞传代培养 / 43

- 附录：一、培养细胞的冻存和复苏 / 46
- 二、MTT 比色法的实验原理和检测方法 / 48
- 三、酶标仪的工作原理和使用方法 / 49

实验五 细胞膜的通透性 / 56

- 附录：一、生物统计学方法 / 59
- 二、细胞吞噬实验 / 65
- 三、细胞融合实验 / 67

实验六 叶绿体的提取和希尔反应活性检测 / 73

- 附录：一、分光光度计的工作原理和使用方法 / 80
- 二、科研论文写作格式和要求 / 81

实验七 线粒体的提取和琥珀酸脱氢酶活性检测 / 96

- 附录：一、细胞内酸性磷酸酶的显示方法 / 101
- 二、考马斯亮蓝 G-250 法测定样品中的蛋白质含量 / 102
- 三、电子显微镜的基本构造和样品制备 / 104

实验八 植物细胞骨架的光学显微镜观察 / 113

- 附录：一、细胞化学技术 / 116
- 二、免疫荧光技术 / 117
- 三、荧光显微镜的基本构造和使用方法 / 118

实验九 外周血淋巴细胞的培养和染色体标本的制备 / 123

- 附录：一、染色体分带技术 / 127
- 二、常用固定剂的成分和作用 / 129

实验十 细胞凋亡的诱导和检测 / 136

- 附录：一、流式细胞仪的工作原理和检测方法 / 140
- 二、Western 印迹技术 / 142

实验十一 自主设计性探究实验 / 155

- 附录：一、学生探究实验论文范本 / 158
- 二、学术报告的 PPT 要求和演讲技巧 / 166

细胞生物学实验报告 / 174

实验一 收集动物组织的活细胞 并计数和测定细胞存活率

一、问题

1. 如何从动物组织中分离出活细胞？
2. 如何知道每毫升血液中红细胞和白细胞的数量？如何知道发酵液中酵母细胞的密度？如何知道培养瓶中细胞的数量？
3. 如何判断收集到的细胞是活细胞还是死细胞？

二、实验方案

1. 采用研磨等机械分离法或蛋白酶消化法将动物组织中的细胞分离出来，制成细胞悬液。
2. 采用血球计数板或自动血球计数仪进行细胞密度的测量。
3. 采用染色法鉴别活细胞和死细胞。

三、背景知识

1. 动物组织活细胞的分离和收集

从动物组织中分离单细胞的方法有机械分离法和蛋白酶消化法。机械分离法适用于较为柔软的组织，例如肝脏和脾脏等，通常采用研磨棒或注射器活塞（推棒）对组织进行机械研磨，得到组织匀浆液，用纱布或尼龙布过滤除去未研磨开的组织块，即可制备单细胞悬液。蛋白酶消化法是利用蛋白酶降解细胞连接处的蛋白质，使细胞连接松散，组织中的细胞互相分离，形成含单细胞或细胞团的悬液。

本次实验将学习机械分离法收集小鼠脾脏淋巴细胞。人的脾脏是位于腹腔左上方、横膈膜下方的紫红色器官，质软，呈卵圆形，其长轴与第十肋骨相一致，是人体最大的淋巴器官，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞。脾脏的大小和形态在不同动物间有很大差异，人、狗和鸡的脾脏呈椭圆形，鼠、兔和猪的脾脏呈长索条状。脾脏是胎儿时期主要的造血器官，成人后转变为储存血液的器官。脾脏也是血液循环中的重要过滤器，能清除血液中的异物、病菌以及衰老死亡的细胞，脾内的淋巴细胞和巨噬细胞都参与免疫活动。脾脏还有调节血量和产生淋巴细胞的功能。由

收集动物组织的
活细胞并计
数和测定细胞
存活率

——

于脾脏内含有大量的红细胞和淋巴细胞,要分离得到较纯的淋巴细胞,可以采用低渗处理的方法使红细胞吸水胀破而溶血,以适当的转速离心,弃上清液(含红细胞膜碎片),收集到的沉淀物即为淋巴细胞。

本次实验还将学习从股骨中分离骨髓细胞。骨髓是存在于长骨(如肱骨、股骨)的骨髓腔和扁平骨(如髌骨、肋骨、胸骨、脊椎骨等)的松质骨间网眼中的一种海绵状的组织,能产生血细胞的骨髓略呈红色,称为红骨髓。成人的一些骨髓腔中的骨髓含有很多脂肪细胞,呈黄色,且不能产生血细胞,称为黄骨髓。人出生时,全身骨髓腔内充满红骨髓,随着年龄增长,骨髓中脂肪细胞增多,相当部分红骨髓被黄骨髓取代。本次实验中采用冲洗股骨腔的方法获得骨髓细胞。先剪开股骨两端,用注射器向股骨腔内注射生理盐水,冲洗股骨腔收集冲洗液,制备骨髓细胞悬液。

2. 血球计数板和细胞计数

采用单细胞悬液进行实验研究时,通常需要确定细胞悬液中的细胞密度,即每毫升溶液中所含的细胞个数(个/mL),例如水样中的藻类密度、发酵液中的酵母菌含量、体外培养细胞的接种密度等,所以,细胞计数是细胞生物学的一项基本技术。

细胞计数常采用血球计数板和电子细胞计数仪。血球计数板是一块特制的厚载玻片,中央区域有四条凹槽而形成三个平台,中间平台较宽,它又被一短横槽分隔为两部分,即两个计数室平台,由“H”形沟槽相隔(图 1-1)。每个计数室内共有 9 个大方格。每一大方格长为 1 mm,宽为 1 mm,高为 0.1 mm(盖玻片与计数室平台之间的缝隙厚度),体积为 0.1 mm^3 ,可容纳的溶液是 $0.1 \mu\text{L}$,那么每 mL 溶液中所含细胞数即是视野中每一大方格中数出的细胞数的 10000 倍。

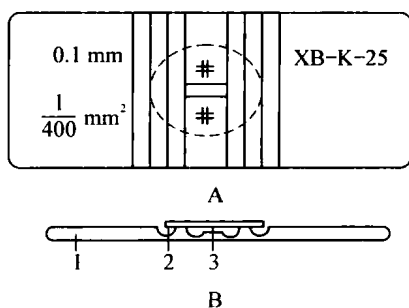


图 1-1 血球计数板的外观图

A. 正面图; B. 纵切面图;

1. 血细胞计数板; 2. 盖玻片; 3. 计数室

计数室四角的 4 个大方格分别被分为 16 个中方格。中央大方格分为 25 个中方格,每个中方格又可分为 16 个小方格,因此中央大方格共含有 400 个小方格(图 1-2)。如果选用血球计数板四角的 4 个大方格进行计数,则称为白细胞计数法,数出四角 4 个大方格内的细胞总数。如果选用血球计数板的中央 1 个大方格进行计数,则称为红细胞计数法,对中央大方格中四角(图 1-2 的 I、II、III 和 IV)和中心(图 1-2 的 V)的 5 个中方格内的细胞进行计数。白细胞计数法适用于数量较少的、体积较大的细胞,而红细胞计数法适用于数量较多的、体积较小的细胞。本次实验采用白细胞计数法对上述制备的脾脏淋巴细胞悬液和骨髓细胞悬液进行计数。

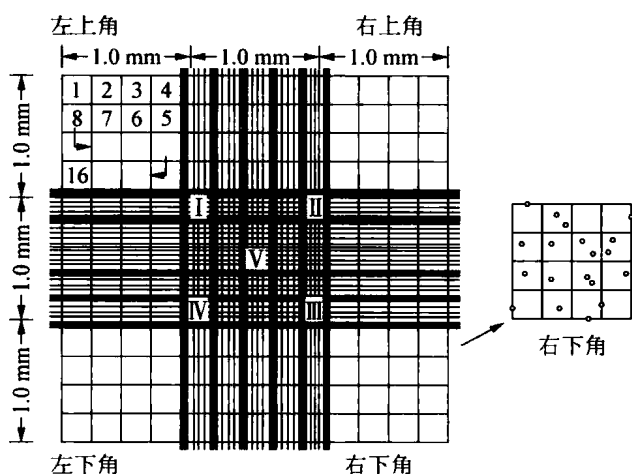


图 1-2 血球计数板的计数室结构

计数时应循一定的规则,以避免遗漏或重复。对压在格线上的细胞,只计左侧和上方的,不计右侧和下方的,即依照“数上不数下,数左不数右”的原则进行计数。数出四角 4 个大方格内的细胞总数,然后按下式计算出每毫升悬液中的细胞数:

$$\frac{\text{四角 4 个大方格中的细胞总数}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数} = \text{细胞数 / mL 悬液}$$

每个大方格内的细胞以 20 个~50 个为宜。如果细胞悬液密度太大,视野中细胞数量太多时,可以将细胞悬液作适当稀释后,用稀释液进行计数,计数结果应乘以稀释倍数以换算成原细胞悬液的密度。

注意区分计数板上的细胞和其他杂质,细胞一般呈圆形或椭圆形,且透亮。计数的细胞应为分散的单个细胞,由 2 个或 2 个以上的细胞形成细胞团按单个细胞计算,但这种情况应少于 10%,否则应重新处理细胞悬液和加样。为计数精确,一般要求每个样品重复计数 2 次,然后计算平均数。

3. 死细胞、活细胞的鉴别和细胞存活率

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞,在总细胞中活细胞所占的百分比称为细胞存活率。细胞存活率是反映细胞群体生活状态的重要指标。从组织中分离出细胞后一般要检查细胞存活率,以了解分离过程是否对细胞造成损伤。冷冻保存后复苏的细胞也要检查细胞存活率,以了解冻存和复苏的效果。

一般难以从外形上把死细胞与活细胞区别开来,通常采用染色排除法鉴别细胞的死活。染色排除法的原理是许多酸性染料,如台盼蓝、苯胺黑等不容易穿过活细胞的细胞膜进入胞内,却能渗入死亡的细胞内,使其着色。因为活细胞的细胞膜具有选择通透性,不能被染料染色,而死细胞的细胞膜通透性增大,染料可以透过死细胞的细胞膜而使死细胞着色。但若染色时间过长,活细胞亦可因受损伤而着色,所以染色后要及时观察。

收集动物组织的活细胞并计数和测定细胞存活率

测细胞存活率时,任意数 100 个以上的细胞,按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{细胞总数} - \text{死细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

4

四、对教师的教学建议

- 1. 两个学生为一组,解剖一只小白鼠,要向学生讲解小白鼠的抓法和解剖方法。
- 2. 讲解和演示用颈椎脱位法处死小白鼠的正确方法,并向学生说明这是一种动物的安乐死方法。
- 3. 细胞悬液的稀释倍数可由学生根据收集液密度自己决定,教师只给一些建议,如脾脏细胞悬液可稀释 10 倍以上,计数时用稀释液,测存活率可用原液等。
- 4. 强调显微镜的正确使用要领,特别是物镜从 4×、10×到 40×的转换,聚光镜和光阑的使用等,建议学生在略暗的视野下计数,在较亮的视野下测细胞存活率。
- 5. 强调离心机的正确使用要领,特别是离心管的平衡以及对称放置。

五、对学生的学习要求

- 1. 学会机械分离法收集动物组织的活细胞。
- 2. 学会使用血球计数板测量细胞悬液的细胞密度。
- 3. 掌握活细胞和死细胞的鉴别方法。
- 4. 对两次计数和测存活率的数据计算平均数,以求结果的精确性。

六、实验材料、器材和试剂

1. 实验材料

小白鼠。

2. 实验器材

解剖剪刀、镊子、培养皿、漏斗、尼龙布、1 mL 注射器、6# 针头、10 mL 离心管、吸管、血球计数板、载玻片、盖玻片、离心机、显微镜。

3. 试剂

(1) D-Hanks 液

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0.06 g(如为 12H ₂ O,则需 0.12 g)
KCl	0.4 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
蒸馏水	1000 mL

(2) 0.4%台盼蓝染液用 D-Hanks 液配制,滤纸过滤。

(3) 0.87% NH_4Cl 溶液。

七、实验步骤

(一) 脾脏淋巴细胞悬液的制备

1. 将 3 周龄~6 周龄小白鼠脱颈椎致死(方法参见附录一)。

2. 沿腹部中线,从后向前剪开腹部皮肤和肌肉,在右手侧用镊子提起肠子,向左侧翻起,可见红褐色长条形的脾脏。用镊子轻轻夹住,取出完整的脾脏,置于培养皿中。将 D-Hanks 液倒入培养皿中洗涤脾脏一次。

3. 用镊子将脾脏置于尼龙布上,将尼龙布置于培养皿的盖子中,用注射器推棒轻轻挤压组织,使细胞分散(注意:适度研磨,如果研磨的力度过大,会造成脾脏细胞的损伤和死亡;如果研磨不够彻底,会留下较多组织团块)。

4. 研磨后将尼龙布置于玻璃漏斗中,将漏斗插入离心管中。用 D-Hanks 液冲洗尼龙布上的组织匀浆,直至从漏斗中流下的冲洗液不浑浊(冲洗液浑浊是因为其中含有大量的细胞),收集细胞悬液于离心管中(注意:一支离心管中最多装 10 mL 细胞悬液)。2000 rpm 离心 5 min(注意:每次离心前一定要在天平上将两支离心管配平,以免损坏离心机),弃上清液(注意:迅速倾倒上清液,不要用吸管吸,以免沉淀物浮起。如果沉淀物浮起,应重新离心)。

5. 在沉淀物中加入 2 mL 0.87% NH_4Cl 溶液,低渗溶解红细胞(注意:按离心管上的刻度衡量溶液的体积)。用吸管轻轻吹打,把沉淀物打散。低渗持续 1 min,随即加入 D-Hanks 液至 10 mL,恢复至等渗。

6. 2000 rpm 离心 5 min,沉淀物即为脾脏淋巴细胞。

7. 加 5 mL D-Hanks 液制成细胞悬液。在实验报告中记录细胞悬液的总体积,即为原液总体积。

8. 由于原液的细胞密度较大,直接计数比较困难,建议用稀释液计数。取出一定体积的原液放入另一支离心管中,加入 D-Hanks 液制备一定稀释倍数的稀释液(注意:稀释时按离心管上的刻度衡量溶液的体积)。而测细胞存活率时可选用细胞密度较大的悬液。

(二) 骨髓细胞悬液制备

1. 在小鼠后肢股骨与脊椎骨相连处,剪断脊椎骨,取下整个后肢(注意:保持两端股骨头的完整,不要剪开股骨头,以免骨髓漏出)。

2. 剔除后肢上的肌肉,并用自来水冲洗干净。截取股骨,保持两端股骨头的完整。

3. 用剪刀将股骨的一端剪开,用 6# 针头的注射器吸取 D-Hanks 液,插入股

收集动物组织
的活细胞并计
数和测定细胞
存活率

骨开口端。然后用剪刀将股骨的另一端也剪开,多次冲洗骨髓腔,直至流出的冲洗液不浑浊(冲洗液浑浊是因为其中含有大量的细胞),收集细胞悬液于离心管中,即为骨髓细胞悬液。在实验报告中记录细胞悬液的总体积。

4. 计数时如果细胞悬液密度适当,可以直接用原液计数;如果细胞悬液密度太大,不方便计数,则适当稀释后计数,并记录稀释倍数。测细胞存活率时建议选用细胞密度较大的悬液。

(三) 细胞计数

1. 取一副血球计数板,把盖玻片盖在血球计数板的两槽中间。将计数板放在显微镜的载物台上。在加样前先观察血球计数板上网格线分布情况,首先在 4×物镜下找到计数室区域,然后转换成 10×物镜观察左上、左下、右上和右下四角大方格的网格线分布(注意:调节显微镜的聚光镜和光阑,使视野偏暗一些,这样容易找到计数室的网格线)。

2. 然后用吸管将制备好的细胞悬液混匀(注意:细胞悬液静置一段时间后,细胞会沉淀下来,取样前必须用吸管充分混匀细胞悬液)。滴一滴细胞悬液于血球计数板上盖玻片的一侧边沿(注意:因为每个计数板有两个计数室,所以可在盖玻片的上下两个边沿进行加样,进行两次计数),使溶液借毛细管现象而自动流入计数室内。加样量要适度,不要溢出盖玻片,也不要过少,避免气泡的发生。如遇上述情况,必须洗净计数板,擦干后重新加样。

3. 加样后,静止 1 min~2 min,待细胞在计数室中下沉后,在 10×物镜下观察计数板四角大方格中的细胞数。依白细胞计数法,数四角 4 个大方格内的细胞总数。然后按公式计算出每 mL 悬液中的细胞数:

$$\frac{\text{四角 4 个大方格中的细胞总数}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数} = \text{个} / \text{mL}$$

4. 分别在两个计数室对细胞悬液进行计数,将结果填写在表 1-1 中,求出 2 次计数结果的平均数。

5. 根据细胞计数得到的结果,分别求出脾脏淋巴细胞和骨髓细胞的总收获量。

表 1-1 细胞密度的测定结果记录

细胞	次序	左上角细胞数(个)	左下角细胞数(个)	右上角细胞数(个)	右下角细胞数(个)	细胞总数(个)	稀释倍数	细胞密度(个/mL)
脾脏细胞	1							
	2							
骨髓细胞	1							
	2							

(四) 细胞存活率的测定

1. 滴一滴细胞悬液或稀释液于清洁的载玻片中央,再滴加一滴 0.4% 台盼蓝染液,轻轻晃动载玻片,使染液和细胞悬液混匀(注意:如果观察原液时,视野中细胞数量适当,则可以直接测定细胞存活率;如果原液细胞密度太大,则建议用稀释液测定细胞存活率)。

2. 用镊子捏取盖玻片,盖上盖玻片,先在低倍镜下观察细胞着色情况。然后换用高倍镜,在 40×物镜下观察多个视野,任意数 100 个以上的细胞(多个视野的细胞总和),按公式计算细胞存活率:

细胞存活率(%) = (细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数 × 100%

3. 将细胞存活率的测量结果记录在表 1-2 中。

表 1-2 细胞存活率的测定结果记录

细胞	视野一 死细胞/细胞 总数(个)	视野二 死细胞/细胞 总数(个)	视野三 死细胞/细胞 总数(个)	视野四 死细胞/细胞 总数(个)	细胞 总数 (个)	死细 胞总 数(个)	细胞 存活 率(%)
脾脏 细胞							
骨髓 细胞							

八、作业

- 1. 记录实验数据并进行分析,完成实验报告。
- 2. 阅读文献资料并回答相关问题。
- 3. 填写自评表格。

九、探究实验小建议

- 1. 不同生物的血液中红细胞或白细胞数量的比较。
- 2. 应用血球计数板对细胞器,如叶绿体、线粒体和细胞核,进行计数。
- 3. 采用细胞计数法,制作细胞生长曲线。
- 4. 探究影响细胞生长或存活率的因素。

附 录

一、实验动物(小鼠)的抓取和处死方法

1. 小鼠在生命科学研究中的应用

小鼠(mouse)是目前世界上用量最大、用途最广、品种最多的实验动物。实验

收集动物组织的活细胞并计数和测定细胞存活率

小鼠来自野生小鼠,经过人们长期选择培育而成。

由于小鼠的繁殖力强,便于大量人工饲养,可用于动物实验,如药物筛选、毒理试验、药物效价比较等。由于其妊娠期短,繁殖力强,也常用于避孕药试验和营养试验。小鼠对多种疾病比较敏感,如流行性感、血吸虫病、疟疾、狂犬病和一些细菌性疾病,因此可用于实验治疗。人工接种方法或化学致癌物在小鼠中易引起肿瘤,可用于肿瘤的研究等。小鼠还广泛用于血清、菌苗、疫苗等生物制品的生物鉴定。总之,小鼠被广泛应用于生物学、医学、兽医学、生理学、遗传学、发育学等方面,为科学研究和生产提供了方便。

2. 小鼠的抓取方法

从笼盒内将小鼠尾部抓住并提起,放在解剖盘或实验台上,轻轻向后拉着鼠尾。

对小鼠进行灌胃以及肌肉、腹腔和皮下注射时,右手向后拉着鼠尾,在小鼠向前挣脱时,用左手(熟练者也可用同一只手)的拇指和食指抓住两耳和颈部皮肤,无名指、小指和手掌心夹住背部皮肤和尾部,并调整好动物在手中的姿势。

3. 颈椎脱位法处死小鼠

右手抓住鼠尾用力向后拉,同时左手拇指和食指用力向下按住头部,在颅骨基部的后侧与脊椎两侧,施加压力(图 1-3),使头颅和脑一起与脊髓分离,小鼠会立即死亡。当脊髓与脑分离时,常伴有大量的肌肉活动。经研究证明,这种方法能使小鼠对痛觉不再敏感。

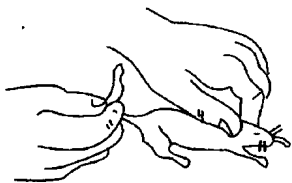


图 1-3 颈椎脱位法演示图

二、普通光学显微镜的基本构造和使用方法

(一) 光学显微镜的基本构造

光学显微镜主要由机械部分和光学部分构成(图 1-4)。

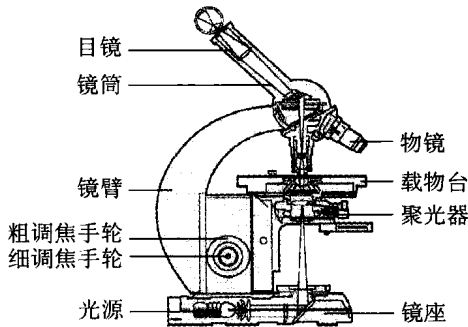


图 1-4 光学显微镜的结构