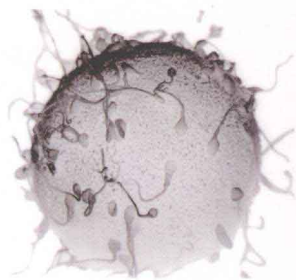


21

世纪高等院校生命科学实验系列教材

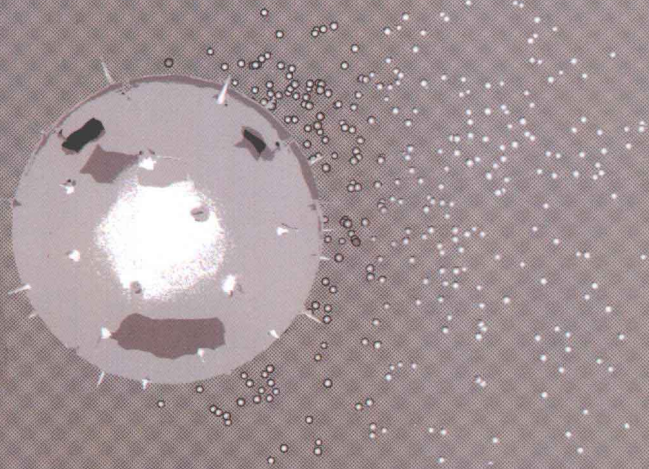


细胞 XIBAO

生物学实验指导

SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

唐玉林 彭 勇 郑易之 编著



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

21

世纪高等院校生命科学实验系列教材

细胞 XIBAO 生物学实验指导

SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

唐玉林 彭勇 郑易之 编著



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

·广州·

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验指导/唐玉林, 彭勇, 郑易之编著. —广州: 华南理工大学出版社, 2011. 8

21 世纪高等院校生命科学实验系列教材

ISBN 978-7-5623-3492-7

I. ①细… II. ①唐… ②彭… ③郑… 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 149434 号

总发行: 华南理工大学出版社 (广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

营销部电话: 020-87113487 87110964 87111048 (传真)

E-mail: scutc13@scut.edu.cn

<http://www.scutpress.com.cn>

责任编辑: 黄丽谊

印刷者: 湛江日报社印刷厂

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 7 字数: 179 千

版次: 2011 年 8 月第 1 版 2011 年 8 月第 1 次印刷

印数: 1 ~ 1 200 册

定价: 16.00 元

版权所有 盗版必究

前 言

细胞生物学是生命科学中最为重要的基础性学科之一。细胞生物学又是生命科学的生长点和各大分支学科的交汇点。它的发展代表并反映当代生命科学发展的最高水平和最新成就。它的内容广，发展快，相关的新成果、新理论、新技术不断涌现。为适应学科的快速的发展，我们根据多年的教学实践经验，结合编者的相关科研成果，参阅国内外同行的大量资料，编写了本教材。

本书主要从基础性、综合性、设计与创新性三个不同层次进行设计编写，共有 28 个实验。基础性实验部分主要包括显微及制片技术以及细胞结构、组分、生命活动分析等几方面的内容，这部分实验的目的是为了巩固学生对细胞生物学理论知识、基本概念的理解和认识，使学生掌握细胞生物学的基本实验技能和操作方法；综合性实验部分特别设计了动植物细胞培养、单克隆抗体的制备、基因导入、基因鉴定等细胞工程及与细胞生物学相关的分子生物学技术，强调细胞操作技术和综合实验技能；设计与创新性实验则强调对各项细胞生物学实验技术的灵活应用，通过实验的实施，初步培养学生从事科学研究和论文写作的能力。此外，书后的附录列出了实验中常用的相关资料和信息，为读者提供了方便。

本书内容丰富、技术操作性强，可作为高等院校生命科学及其相关专业的本科生、研究生的实验教材，也可作为相关研究人员的参考用书。

本书的出版得到了广东省生物科学实验教学示范中心建设专项经费的资助。本书是深圳大学生物科学实验中心的系列实验教材之一，由唐玉林统筹组织，其

前 言

中实验 1 ~ 4、15 ~ 19、25 ~ 26 由彭勇编写，实验 8 ~ 14、20 ~ 24、27 ~ 28 由唐玉林编写，实验 5 ~ 7 及附录部分由郑易之编写。东北师范大学生命科学学院孙晖教授对本书内容进行了审阅并提出了宝贵意见，深圳大学吴海强博士对书中的部分图表进行了修改，在此一并表示感谢。

本书编写人员虽然各具相应的专业特长，且均是教学科研的一线老师，但鉴于知识和能力所限，书中的缺点与错误难免，恳请广大读者予以批评指正。

编 者

2011 年 8 月

目 录

实验室规则	1
细胞生物学实验绘图方法与要求	2
第一部分 基础性实验	3
第 1 章 显微及制片技术	5
实验 1 普通显微镜及其使用	5
实验 2 特殊显微镜及其使用	9
实验 3 透射电子显微镜的结构、原理及超薄切片的制备	16
实验 4 扫描电子显微镜的标本制备与观察	19
第 2 章 细胞结构的显示及细胞器的分离分析技术	21
实验 5 植物细胞液泡和动物细胞液泡系的超活染色	21
实验 6 线粒体超活染色技术	24
实验 7 细胞骨架观察——微管的间接免疫荧光观察	26
实验 8 差速离心法分离细胞核和叶绿体	28
第 3 章 细胞组分的组织化学分析	31
实验 9 DNA 的细胞化学显示法——Feulgen 反应	31
实验 10 RNA 的细胞化学显示法——Brachet 反应	35
实验 11 细胞中多糖的显示——PAS 反应	37
实验 12 细胞中过氧化物酶的显示——联苯胺反应	39
实验 13 巨噬细胞酸性磷酸酶的显示	41
实验 14 小白鼠肝组织细胞碱性磷酸酶的显示	44
第 4 章 细胞生命活动分析	46
实验 15 细胞有丝分裂的形态观察	46
实验 16 细胞减数分裂的形态观察	48
实验 17 巨噬细胞的吞噬活动	51
实验 18 死活细胞的鉴别	53
实验 19 光镜下调亡细胞的形态观察	55

目 录

第二部分 综合性实验	57
第 5 章 植物细胞培养及基因导入技术	59
实验 20 植物组织或细胞培养基的配制	59
实验 21 植物细胞的继代培养	64
实验 22 植物细胞转基因技术及外源基因的表达分析	66
实验 23 植物原生质体的分离与基因导入技术	70
实验 24 植物基因组 DNA 的提取及转基因植株的分子鉴定	73
第 6 章 动物细胞培养技术及应用	79
实验 25 动物细胞的原代培养	79
实验 26 单克隆抗体的制备	81
第三部分 设计与创新性实验	89
实验 27 细胞凋亡的诱导和检测	91
实验 28 利用染色体畸变和微核实验进行安全毒理评价和环境检测 ...	94
附录	97
附录 1 细胞生物学常用溶液	97
附录 2 细胞生物学常用染色剂	99
附录 3 常用玻璃、塑料仪器的清洗和干燥	103
参考文献	104

实验室规则

一、遵守实验纪律，上课不得迟到或早退。实验中途因故需外出时应向任课教师请假。

二、进入实验室之前要换好白色实验服。

三、保持实验室安静，不许在实验室内大声喧哗及随意走动。

四、必须严肃认真地进行实验。实验期间不得进行任何与实验无关的活动。

五、实验室内各组仪器及器材由各组自己使用，不得互相调换。要爱护仪器、标本和设备。如遇仪器损坏或不灵，应及时报告任课教师，以便修理或更换，不得自行修理。损坏器材或设备者应按有关规定进行赔偿。

六、注意节约实验材料、药品，以及水、电等。

七、保持实验室内清洁整齐。实验结束后，各组必须认真清理各自的实验台面，将器材清洗后点清数目，然后摆放整齐。班级值日生负责清扫室内卫生，关好水、电开关和门、窗等，经教师允许后方可离开实验室。

八、有不遵守上述要求者，任课老师将终止其实验，并取消其当次实验成绩。

细胞生物学实验绘图方法与要求

一、在仔细观察的基础上，选择典型结构进行描绘，要求真实、准确。注意各部结构的比例关系。

二、用铅笔绘图，线条要明确清晰，图的深浅明暗一律以点的疏密来表示，点要圆而一致，不得涂暗影或进行其他美术加工。

三、各部结构名称要在一侧引直线注明。各引线之间应平行，不得交叉。

四、每幅图的大小、位置在页面上必须安排得当，并注意页面的整洁。



第一部分

基础性实验

第1章 显微及制片技术

实验1 普通显微镜及其使用

【实验目的】

了解普通光学显微镜的构造及其原理，并熟练掌握其操作方法。

【实验原理】

1. 显微镜的基本构造

显微镜由机械装置和光学系统两大部分组成。

(1) 机械装置

镜座和镜臂：镜座位于显微镜底部，呈马蹄形，它支撑全镜。镜臂有固定式和活动式两种，活动式的镜臂可改变角度。

镜筒：是由金属制成的圆筒，上接目镜，下接转换器。镜筒有单筒和双筒两种，单筒又可分为直立式和后倾式两种，而双筒则都是倾斜式的，倾斜度为 45° 。双筒中的一个目镜有屈光度调节装置，以备在两眼视力不同的情况下调节使用。

转换器：为两个金属碟所合成的一个转盘，其上装3~4个物镜，可使每个物镜通过镜筒与目镜构成一个放大系统。

载物台：为方形或圆形的盘，用以载放被检物体，中心有一个通光孔。有的载物台上装有两个金属压夹，称标本夹，用以固定标本；有的装有标本推动器，将标本固定后，能向前后左右推动。有的推动器上还有刻度，能确定标本的位置，便于找到变换的视野。

调焦装置：是调节物镜和标本间距离的机件，有粗动螺旋（粗调节器）和微动螺旋（细调节器），利用它们使镜筒或镜台上下移动，当物体在物镜焦点上时，则得到清晰的图像。

(2) 光学系统

物镜：物镜安装在镜筒下端的转换器上，因接近被观察的物体，故又称接物镜。其作用是将物体作第一次放大，是决定成像质量和分辨能力的重要部件。物镜上通常标有数值孔径、放大倍数、镜筒长度、焦距等主要参数。如： $NA0.30$ ； $10\times$ ； $160/0.17$ ； 16 mm 。其中“ $NA0.30$ ”表示数值孔径（numerical aperture，简写为NA）；“ $10\times$ ”表示放大倍数；“ $160/0.17$ ”分别表示镜筒长度和所需盖玻片厚度（mm）；“ 16 mm ”表示焦距。

显微镜的物镜通常有低倍物镜（ $10\times$ ）、高倍物镜（ $40\times$ ）和油镜（ $100\times$ ）三种。油镜通常标有白圈，也有的以“OI”（oil immersion）字样表示，它是三者中放大倍数最大的。

使用时，油镜与其他物镜的不同是载玻片与物镜之间不是隔一层空气，而是隔一层油

质，称为油浸系。这种油常选用香柏油，因为香柏油的折射率 $n = 1.52$ ，与玻璃相同。当光线通过载玻片后，可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射。如果玻片与物镜之间的介质为空气，则称为干燥系，当光线通过玻片后，受到折射发生散射现象，进入物镜的光线显然减少，会使视野的照明度减低。

目镜：装于镜筒上端，由两块透镜组成。目镜把物镜造成的像再次放大，分辨率不增加，上面一般标有 $10\times$ 、 $15\times$ 等放大倍数，可根据需要选用。目镜的放大倍数过大反而影响观察效果。

聚光器：光源射出的光线通过聚光器汇聚成光锥照射标本，增强照明度和造成适宜的光锥角度，提高物镜的分辨率。聚光器由聚光镜和虹彩光圈组成，调节聚光镜的高度和虹彩光圈的大小，可得到适当的光照和清晰的图像。

光源：较新式的显微镜其光源通常安装在显微镜的镜座内，通过按钮开关来控制；老式显微镜则大多利用附着在镜臂上的反光镜。反光镜是一个两面镜子，一面是平面，另一面是凹面。

滤光片：可见光是由各种颜色的光组成的，不同颜色的光线波长不同。如只需某一波长的光线时，就要用滤光片。选用适当的滤光片，可以提高分辨率，增加影像的反差和清晰度。滤光片的颜色有紫、青、蓝、绿、黄、橙、红等，可分别透过不同波长的可见光，使用时根据标本本身的颜色，在聚光器下放置相应的滤光片。

2. 显微镜的分辨率

显微镜的放大效能是由其数值孔径决定的。所谓数值孔径，即光线投射到物镜上的最大角度（称为镜口角）的一半的正弦，乘上玻片与物镜间介质的折射率所得的乘积，可用下列公式表示：

$$NA = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中 NA ——物镜的数值孔径；

n ——介质的折射率；

α ——标本在光轴上的一点对物镜镜口的张角。

空气中 $n = 1$ ，油镜下 n 可提高到 1.5；因此利用油镜能增加数值孔径。光线投射到物镜的角度愈大，显微镜的效能就愈大，该角度的大小取决于物镜的直径和焦距，通常 α 的最大值可达 140° 。

显微镜的分辨率是指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力，又称分辨力。它与物镜的数值孔径成正比，与光波长度成反比。因此，物镜的数值孔径愈大，光波波长越短，则显微镜的分辨率愈大，被检物体的细微结构也愈能明晰地区别出来。一个高的分辨率意味着一个小的可分辨距离，这两个因素是成反比关系的。

显微镜的分辨率可用可分辨的最小距离来表示：

$$R = \frac{0.61\lambda}{NA} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}$$

式中 R ——分辨率（两点的最短距离）；

λ ——照明光线波长。

最短的可见光波长为 450 nm；油镜物镜的最大数值孔径为 1.4。因此，油镜下 R 值约

等于 $0.2\ \mu\text{m}$ 。两物点间距离若小于 $0.2\ \mu\text{m}$ ，就不能分辨，只能看做是一个点。

【操作步骤】

1. 观察前的准备

(1) 显微镜从显微镜柜或镜箱内拿出时，要用右手紧握镜臂，左手托住镜座，平稳地将显微镜搬运到实验桌上。

(2) 将显微镜放在自己身体的左前方，离桌子边缘约 $10\ \text{cm}$ ，右侧可放记录本或绘图纸。

(3) 调节光照：调节光源亮度到最低，打开电源。将 $10\times$ 物镜转入光孔，将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置，用左眼观察目镜中视野的亮度，转动虹彩光圈，使视野的光照达到最明亮最均匀为止。自带光源的显微镜，可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。检查染色标本时，光线应强；检查未染色标本时，光线不宜太强。可通过扩大或缩小光圈、升降聚光器、调节光源强弱等方式调节光线。

2. 低倍镜观察

镜检任何标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定检查的位置。

将标本片放置在载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本处在物镜正下方，转动粗调节旋钮，使物镜调至接近标本处，用目镜观察并同时用粗调节旋钮慢慢下降载物台，直至物像出现，再转动细调节旋钮使物像清晰为止。用推动器移动标本片，找到合适的目标并将它移到视野中央进行观察。

3. 高倍镜观察

在低倍镜观察的基础上转换高倍镜。较好的显微镜其低倍、高倍镜头是同焦的，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调节旋钮，慢慢下降载物台直至物像出现，再用细调节旋钮调至物像清晰为止，找到需要观察的部位，移至视野中央进行观察，并准备用油镜观察。

4. 油镜观察

(1) 转动粗调节器将镜筒提起约 $2\ \text{cm}$ ，将油镜转至正下方。

(2) 在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。

(3) 从侧面注视，转动粗调节器将镜筒小心地降下，使油镜浸在香柏油中，其镜头几乎与标本相接，应特别注意不能压在标本上，更不可用力过猛，否则不仅压碎玻片，也会损坏镜头。

(4) 从目镜内观察，进一步调节光线，使光线明亮，再转动粗调节器将镜筒徐徐上升，直至视野出现物像为止，然后转动细调节器校正焦距。如油镜已离开油面而仍未见物像，必须再从侧面观察，将油镜降下，重复上述操作直至物像看清为止。

5. 观察完后复原

下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚乙醇混合液擦去镜头上残留油迹，最后再用擦镜纸擦拭 $2\sim 3$ 下即可。

将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜头不与载物台通光孔相对，而是成八字形位置，再将载物台下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，最后用柔软纱布清洁载

物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

【注意事项】

- (1) 学生使用显微镜固定镜号、位置，填写使用卡，本学期一直使用本台显微镜。
- (2) 不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。
- (3) 拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜拿。
- (4) 开关显微镜时，一定要把光源调节到亮度最低，以保护显微镜灯泡。
- (5) 观察标本时，必须依次用低倍镜、高倍镜，最后用油镜。当目视目镜时，特别是使用油镜时，切不可使用粗调节器，以免压碎玻片或损伤镜面。
- (6) 观察时，两眼睁开，养成两眼能够轮换观察的习惯，以免眼睛疲劳，并且能够在左眼观察时，右眼注视绘图。
- (7) 转换物镜镜头时，不要搬动物镜镜头，只能转动转换器。
- (8) 切勿随意转动调焦手轮。使用微动调焦旋钮时，用力要轻，转动要慢，转不动时不要硬转。
- (9) 使用高倍物镜时，勿用粗动调焦手轮调节焦距，以免移动距离过大，损伤物镜和玻片。
- (10) 镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布，以保证光洁度。

【思考题】

1. 油镜与普通物镜在使用方法上有何不同？应特别注意些什么？
2. 使用油镜时，为什么必须用香柏油？
3. 镜检标本时，为什么要先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

实验 2 特殊显微镜及其使用

相差显微镜

【实验目的】

掌握相差显微镜的原理、构造及其使用方法。

【实验原理】

相差显微镜是能将物体本身的相位差（或光程差）转换为振幅（或光强度）变化的显微镜。人眼仅能观察到可见光的波长（颜色）及振幅（亮度）的差别。活的生物体多为无色透明，当光线通过时，波长和振幅很少发生变化，而生物材料各部分之间以及与环境之间往往有折射率的差别，光线通过后可产生相位的改变。相差显微镜能将看不见的相位改变转换为看得见的振幅变化。

照明光线通过活细胞时，虽然波长及振幅没有明显的变化，但由于细胞的各部分及细胞与周围介质之间的折射率有所差别，当光线通过各种界面时，一部分直接通过细胞称为直射光，另一部分变为衍射光。衍射光与直射光的波长一致，但衍射光的相位比直射光推迟约 $1/4$ 波长。从标本某一点发出的直射光和衍射光经物镜会聚以后，在物镜的像场交于一点，衍射光与直射光就会发生干涉，形成合成光波。合成光的波长仍与原来相同，但振幅为两束光的几何叠加。在普通显微镜下，叠加结果没有明显变化，故难以观察标本及其细微结构。在相差显微镜中，通过改变衍射光或直射光的相位，将直射光和衍射光的相位差变成振幅差，就可以观察到标本各部分的差别了。改变相位由相板来完成。如果推迟直射光的相位 $\frac{1}{4}\lambda$ ，则直射光和衍射光的相位相同，会发生相长干涉，合成光比直射光明亮，称负反差。如果推迟衍射光的相位 $\frac{1}{4}\lambda$ ，则直射光比衍射光超前 $\frac{1}{2}\lambda$ ，这时发生相消干涉，合成光比直射光暗，称正反差。

相差显微镜的主要装置有两个：环状光阑和相板。环状光阑是装在聚光镜中的环状通光孔，随着物镜倍数的改变，要改变其大小。通常将 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 四种配合物镜的环状光阑安装在一个软盘内，与聚光器一起组成转盘聚光器。在转盘前还有一个标示孔，转动转盘时 0、10、20、40、100 依次进入标示孔，这表示与相应物镜相配合的环状光阑置入光路，“0”表示明视野，这时与普通显微镜是一样的，转盘上有供合轴调整用的调节钮，有的是固定在其上的，有的是分开的。

相板是安装在物镜后焦点上的，带相板的物镜称为相差物镜，以 ph 标记。相板可以分为两个部分：一部分为共轭面，为环状，通过环状光阑的直射光经物镜会聚后，正好落在共轭面上；另一部分为补偿面，大量衍射光透过这一区域。相板上镶有相位膜，通常为金属电解质 MgO ，它能推迟光线的相位（常为 $\frac{1}{4}\lambda$ ）。如涂在共轭面上，则推迟直射光的相