

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材

高等师范院校生物学系列实验教材

细胞生物学 实验指导

主 编 曾宪录 巴雪青 朱筱娟



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

第2版 2006年12月第1次印刷
2006年12月第1次印刷

细胞生物学

实验指导

主编 王德成 副主编 王德成

第2版 2006年12月第1次印刷
2006年12月第1次印刷

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材
高等师范院校生物学系列实验教材

细胞生物学 实验指导

Xibao Shengwuxue Shiyān Zhidao

主 编 曾宪录 巴雪青 朱筱娟

编 者 (按姓氏笔画排序)

王秀莉 王洪振 巴雪青 刘文广

冯学超 朱筱娟 张桂荣 张 瑜

陆 军 高 杨 高 翔 焦明大

曾宪录



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS · BEIJING

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验指导 / 曾宪录, 巴雪青, 朱筱娟主编. —北京: 高等教育出版社, 2011.12

ISBN 978-7-04-027033-4

I. ①细… II. ①曾… ②巴… ③朱… III. ①细胞生物学—实验—
高等师范院校—教材 IV. ①Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2011) 第264180号

策划编辑 吴雪梅

责任编辑 高新景 王 莉

封面设计 张雨微

责任印制 田 甜

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京铭传印刷有限公司
开 本 787×1092 1/16
印 张 10.75
字 数 250 000
插 页 2
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2011年12月第1版
印 次 2011年12月第1次印刷
定 价 19.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 27033-00

细胞是生物结构和生命活动的基本单位,“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找答案”。细胞生物学是研究细胞生命活动规律的科学,它既是生命科学的基础学科,也是前沿学科,对细胞的了解和研究是现代生命科学发展的基础之一。细胞生物学是一门实验性很强的学科,众多快速发展的生物新技术推动了细胞生物学的发展。

近年来,随着生命科学的迅猛发展,细胞生物学的课程体系和内容发生了很大变化。相对而言,细胞生物学实验课教学还不能很好适应学科发展和人才培养的需求,迫切需要实验课教材的推陈出新。此外,随着高等院校教学和实验条件的不断改善,一些对仪器设备、实验经费和相关技术等依赖性较强的实验也能够得以为本科生开设。本书正是在这样一个背景下编写的,旨在让本科生掌握细胞生物学的基本实验技能和研究方法,了解和学习先进和复杂技术及仪器的使用操作,以及进行一些简单的科研训练。

本书分为4篇,共编入36个实验和中学生物学中细胞生物学相关实验解析。内容涉及光学和电子显微镜技术,细胞显微结构和超微结构的观察,细胞中亚细胞结构及大分子的分离和提取,细胞中特定分子的标记和鉴定,研究细胞运动、细胞周期、细胞分化和细胞凋亡等的基本方法,细胞和组织的培养技术,以及细胞融合、转基因和干细胞操作等技术方法。书中每个实验都包括背景与原理,实验目的,教学安排,材料、试剂与仪器,方法与步骤,结果与讨论,注意事项与建议,思考题和参考文献9个部分。本书实验内容的主体是学生可以在3个学时以内完成的基础实验,同时也设计了一些学生需要2~3天甚至更长时间才能完成的综合性实验和研究性实验,以利于创新型人才的培养和满足部分对细胞生物学实验有浓厚兴趣的学生的需求。为了适应高等师范院校培养高素质的中学教师的需要,本书还编入了中学生物学教学中细胞生物学相关实验解析的内容。这部分内容总结了生物学初中课标和高中课标中细胞生物学相关的实验,并以人民教育出版社出版的相关生物教材为例,对实验的设计、操作、改进等方面提出指导性建议,并对实验中常见的问题进行解析与指导。

本教材为立体化教材,包括纸质印刷本和数字课程两部分。数字课程主要包括

实验结果彩色照片、多媒体教学课件、视频资料,以及对现有中学生物学实验局限性的分析、实验背景知识的补充、实验设计的拓展、中学生物学综合性和研究性实验教学案例等。数字化教学资源采取动态开放、不断完善更新的建设模式。

本书部分内容考虑到了中学生物学教学改革的需要,适合高等师范院校细胞生物学实验课教学使用。本书同时也可作为医学、农林和工学等相关专业的教学和科研人员的参考用书。使用本书时,各校可根据实验室的条件和学时安排等酌情选用其中部分实验内容。

由于编者水平有限,书中难免有错误和遗漏,诚恳希望读者批评、指正。

编 者

2011 年 10 月

第 1 篇 基础性实验

实验 1	细胞成分和结构的染色观察	3
1-1	细胞中 DNA/RNA 的原位特异染色观察	3
1-2	动物细胞骨架(微丝)的明视场显微镜观察	6
1-3	液泡系、线粒体的活体染色与观察	8
实验 2	倒置相差显微镜的了解和使用	12
实验 3	荧光显微镜的了解和使用	18
附 1	动物细胞骨架(微丝)的荧光染色与观察	21
附 2	细胞表面黏附分子的荧光标记及观察	23
附 3	细胞极化现象观察	26
实验 4	细胞和组织中核酸成分的提取	31
4-1	细胞和组织中 DNA 的提取	31
4-2	细胞和组织中 RNA 的提取	34
实验 5	细胞器和细胞结构的分离技术	38
5-1	细胞核的分离	38
5-2	叶绿体的分离	40
5-3	中期染色体的分离	42
实验 6	细胞膜与物质运输	46
6-1	不同性质物质细胞膜通透性的观察比较	46
6-2	细胞吞噬活动的观察	49
实验 7	动物细胞培养技术	52
7-1	细胞的传代培养	52
7-2	细胞生长曲线测定	54
7-3	细胞的冻存和复苏	56
实验 8	外源 DNA 导入哺乳动物细胞技术	59
8-1	磷酸钙沉淀法将 DNA 导入哺乳动物细胞	59
8-2	电穿孔法将 DNA 导入哺乳动物细胞	62

实验 9 细胞体外融合技术	66
9-1 PEG 法诱导鸡血细胞的体外融合	66
9-2 电融合法诱导哺乳动物细胞的体外融合	69
9-3 聚乙二醇法诱导植物原生质体融合	72

第 2 篇 综合性实验

实验 10 新生大鼠海马神经元分离和培养	79
实验 11 碱性磷酸酶的细胞定位	82
实验 12 激光扫描共聚焦显微镜的了解和使用	86
附 激光共聚焦显微镜检测荧光标记的细胞骨架	90
实验 13 流式细胞仪的原理和应用	93
附 1 细胞的同步化诱导及细胞周期的流式细胞仪分析	99
附 2 细胞表面蛋白分子的流式细胞仪检测	102
附 3 细胞凋亡的诱导及其流式细胞仪检测	105
实验 14 透射电子显微镜的了解和使用	109
附 细胞超微结构的透射电子显微镜观察	111
实验 15 扫描电子显微镜的了解和使用	118
附 细胞(或组织、器官)表面结构的扫描电子显微镜观察	120
实验 16 蛋白质的免疫沉淀实验	123
实验 17 染色质的免疫沉淀实验	127

第 3 篇 研究性实验

实验 18 去乙酰化酶抑制剂对肿瘤细胞增殖的影响	135
实验 19 定向诱导成骨细胞分化	139
实验 20 植物愈伤组织培养与分化	143
实验 21 骨髓间充质干细胞的分离、培养和诱导分化	147
实验 22 细胞衰老的诱导及观察鉴定	151

第 4 篇 中学相关生物学实验指导(细胞生物学篇)

一、中学生物课程标准中的细胞生物学实验内容概述	157
二、中学细胞生物学实验指导与设计分析	157
三、中学生物学综合性、研究性实验开发与与设计	159

基础性实验

本篇编入了细胞成分和结构的染色观察、倒置相差显微镜和荧光显微镜的了解和使用、细胞和组织中核酸成分的提取、细胞器和细胞结构的分离制备、细胞膜与物质运输、动物细胞培养、外源 DNA 导入技术和细胞体外融合技术等相关内容的 23 个实验。这些实验内容涵盖了细胞生物学教学和科研的基本知识和技能。基础性实验的主要目的是让学生掌握进行细胞生物学研究的基本方法和过程,培养学生的学习兴趣和动手能力。本篇中的实验内容相对单一,大多是验证性实验,学生可以在一次实验课中完成。

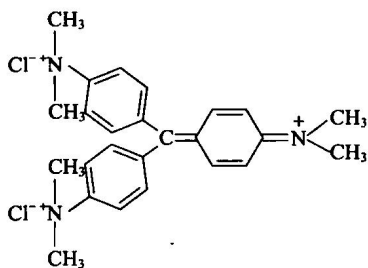
各高校可以根据本校实验教学条件和教学时数的实际情况选择其中的部分实验内容。

细胞成分和结构的染色观察

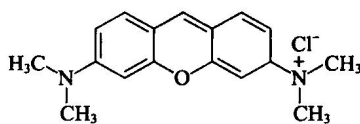
1-1 细胞中 DNA/RNA 的原位特异染色观察

【背景与原理】

甲基绿(methyl green)与派洛宁(pyronin)均为碱性染料,两者均是多苯环化合物,其中甲基绿包含两个带正电荷的苯环,派洛宁则只有一个带正电荷的苯环。由于两化合物均能与细胞中的 DNA、RNA 结合而呈现不同颜色,所以广泛用于细胞内核酸的特异定位染色。甲基绿与派洛宁化学结构不同,它们与核酸结合的能力差异很大:甲基绿主要与双链 DNA 及富含 CG 的单链 DNA 结合而显示绿色;派洛宁主要与 RNA 结合而显示红色。由于甲基绿结构中有两个苯环带正电荷,能与双链 DNA 中带负电荷的磷酸分子相结合而呈绿色,当甲基绿与派洛宁作为混合染料时,甲基绿和染色质中 DNA 选择性结合显示绿色或蓝色,派洛宁与核仁、细胞质中的 RNA 选择结合显示红色。其原因可能是两种染料在混合染液中有竞争作用,同时两种核酸分子都是多聚体,而其聚合程度有所不同。甲基绿易与聚合程度高的 DNA 结合呈现绿色,而派洛宁则与聚合程度较低的 RNA 结合呈现红色。即 RNA 对派洛宁亲和力大,被染成红色,而 DNA 对甲基绿亲和力大,被染成蓝绿色。



甲基绿



派洛宁

该方法源于 1901 年,当时 Unna 改用酸性溶液对细胞核和细胞质染色,发现只有在中性或微酸性(pH 5~6)时细胞才能着色,细胞核中的大部分区域被染成绿或蓝绿色,而细胞质及核仁中的嗜碱质被染成暗红或红色。所用试剂被称为“Unna 试剂”。1940 年 Brachet 在研究两栖类卵子发育时用 Unna 试剂对细胞进行染色,结果证明被染成绿色或蓝绿色的物质为 DNA,染成红色或暗红色的物质为 RNA。所以,该方法也称为“Brachet 反应”。用该方法可以对细胞中的 DNA 分子和 RNA 分子进行定位、定性及定量分析。

【实验目的】

1. 了解甲基绿 - 派洛宁法反应的原理。
2. 掌握甲基绿 - 派洛宁法反应的操作方法。

【教学安排】

本实验在教师的指导下,可由学生独立完成。建议不分组,以学生个人为单位进行操作。

【材料、试剂与仪器】

1. 实验材料

洋葱鳞茎内表皮。

2. 实验试剂

(1) $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基绿水溶液 称取 1 g 甲基绿,溶于 50 mL 蒸馏水中,置于棕色瓶中保存。不同批次的甲基绿粉末的纯度有较大变化,其中往往混有甲基紫杂质,该杂质可影响染色效果,需预先除去。可以用三氯甲烷萃取除去甲基紫杂质,具体方法为:将 0.5 g 甲基绿粉末溶于 30 mL 蒸馏水中,待其充分溶解后转移至 100 mL 梨形分液漏斗中,然后加入足量的三氯甲烷,用力振荡,然后静置,分为两层,上液层为甲基绿的水溶液,下液层为甲基紫的三氯甲烷溶液,弃去下层液,再加入三氯甲烷重复数次,直至三氯甲烷中无甲基紫为止,最后放入 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中干燥。按上述方法配制成 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基绿溶液。

(2) $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 派洛宁水溶液 称取 1 g 派洛宁 G (pyronin G),溶解于 20 mL 蒸馏水中,置于棕色瓶中保存。派洛宁 G 溶解较差,在配制过程中可以加热促溶。

(3) $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲液 (pH 4.8) 分别配制 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸溶液和 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液。然后量取 41 mL $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸溶液与 59 mL $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液充分混合,即为 pH 为 4.8 的 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲液。

(4) 甲基绿 - 派洛宁染液 取 5 mL $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基绿水溶液, 1 mL $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 派洛宁水溶液混合,然后加入 12 mL 蒸馏水和 18 mL 的 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲液 (pH 4.8),充分混合即可。

(5) $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸 称取 5 g 三氯乙酸,溶于 100 mL 蒸馏水中。由于三氯乙酸具有较强腐蚀性,配制时应戴手套和口罩。

3. 实验仪器

正置显微镜,恒温水浴箱,解剖针,眼科镊子,手术刀,滴管,载玻片,盖玻片,滤水纸。

【方法与步骤】

1. 用滴管在载玻片中央滴一滴蒸馏水,用手术刀切取一小块洋葱鳞茎,用镊子从鳞茎上撕取内表皮一小块,置于载玻片上,用镊子小心展开铺平。

2. 用吸管在组织上滴加甲基绿 - 派洛宁染液,染色 30 min 。

3. 吸取数滴蒸馏水冲洗染色洋葱表皮,并立即用滤纸吸去多余的水分。由于派洛宁与 RNA 亲和力较小,容易脱色,所以在洗样本时需要进尽快吸取多余的蒸馏水。按此法重复 1 次。

4. 盖盖玻片并用中性树脂封片,封片时要避免产生气泡。

5. 在正置显微镜下观察染色结果并照相。

对照组的制备:按1所述方法撕取洋葱鳞茎表皮,经 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中处理 15 min。再经 70% 乙醇漂洗片刻,然后按步骤 2~5 制片观察。

【结果与讨论】

本实验采用 Brachet 反应对洋葱鳞茎内表皮细胞中的 DNA 和 RNA 进行特异染色,从图 1-1A 中可以看出:鳞茎内表皮细胞 DNA 所在的细胞核被染成蓝绿色,有 RNA 分布的细胞质及细胞核核仁被染成红色。图 1-1B 为经 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸处理的对照组,细胞壁不完整,细胞核及细胞质未被特异染色。

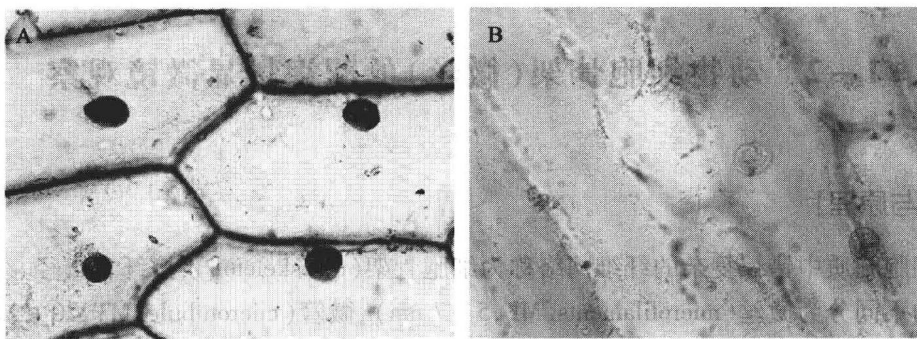


图 1-1 Brachet 法对洋葱鳞茎内表皮细胞中 DNA 和 RNA 染色(参见彩色图版)

A. 实验样品 B. 经三氯乙酸处理的对照样品

【注意事项与建议】

1. 甲基绿纯度是本实验成功与否的关键,所以,实验中必须预先去除所含的甲基紫等杂质。
2. 由于配制好的甲基绿-派洛宁染液易氧化,且在光照下氧化加剧,尽量现配现用。若是配制完用不了,应在棕色试剂瓶避光保存。
3. 在压片过程中要注意不能用力过大,否则洋葱表皮细胞破裂,细胞核丢失。
4. 要实现对细胞中核酸定位染色,必须是两种染料的混合染液染色。
5. 甲基绿与派洛宁这两种染料混合比例是影响染色效果的关键因素。根据实验要求及所采用的材料,需调整配制比例。两者比例有时应相当(1:1),有时甲基绿用量要大于派洛宁 2 倍以上。

【思考题】

1. 细胞核酸特异染色方法有哪些?各自优缺点是什么?
2. 简述 Brachet 反应的原理。绘图示细胞中 RNA 和 DNA 的分布并说明造成细胞呈色差异的原因。
3. 试述影响 Brachet 反应效果的原因。

参考文献

- [1] Taft E B. The specificity of the methyl green-pyronin stain for nucleic acids. *Experimental Cell Research*, 1951, 2 (3): 312 - 326.
- [2] Chayen J. The methyl green-pyronin method. *Experimental Cell Research*, 1952, 3 (4): 652 - 655.
- [3] Trevan D J, Sharrock A. A methyl green-pyronin-orange G stain for formalin-fixed tissues. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1951, 63 (2): 326 - 329.

(冯学超)

1-2 动物细胞骨架(微丝)的明视场显微镜观察

【背景与原理】

真核细胞胞质中错综复杂的纤维网络称为细胞骨架(cytoskeleton),按纤维直径、组成成分和组装结构的不同分为微丝(microfilaments, MF, 5 ~ 7 nm)、微管(microtubule, MT, 20 ~ 25 nm)和中等纤维(intermediate filaments, IF, 8 ~ 11 nm)。它们对细胞形态的维持,细胞的生长、运动、分裂、分化,物质的运输,能量转换,信息传递和基因表达等起到重要作用。

微丝是肌动蛋白亚单位组成的螺旋状纤维(F-actin),在不同种类的细胞中,它们又与某些结合蛋白一起形成不同的亚细胞结构,如张力纤维、肌肉细丝、肠上皮绒毛轴心等。观察微丝可以用电镜、组织化学、免疫细胞化学等手段。本实验用考马斯亮蓝 R250(Coomassie brilliant blue R250)染色,在光学显微镜下显示微丝组成的张力纤维(stress fiber)。张力纤维在体外培养细胞中普遍存在,与细胞对基质的附着、维持细胞扁平铺展的形状有关。活体内哪些细胞具有张力纤维研究较少,比较明确的是,一些迅速运动的细胞如巨噬细胞、变形虫等缺乏张力纤维。张力纤维的组成除了肌动蛋白外,还有一些肌动蛋白结合蛋白,如辅肌动蛋白、肌球蛋白和原肌球蛋白沿着纤维轴向周期性地分布着,类似于肌原纤维的组织分布,并具有收缩功能。

Triton X-100 是一种常用的非离子去垢剂,是一类即具有亲水基又具有疏水基的物质,一般具有乳化、分散和增溶作用。当用适当浓度的 Triton X-100 处理细胞时,细胞质膜中和细胞质中的游离蛋白和全部脂质被溶解抽提,但细胞骨架系统的蛋白质不被破坏而被保存,经戊二醛固定,考马斯亮蓝 R250 染色后,可在光学显微镜下观察到由微丝组成的微丝束为网状结构,就是细胞骨架。

考马斯亮蓝 R250 是一种普通的蛋白质染料,它可以使各种细胞骨架蛋白着色,并非特异地显示微丝,但是由于有些细胞骨架纤维在该实验条件下不够稳定,如微管;而有些类型的纤维太细,在光学显微镜下无法分辨,因此我们看到的主要是微丝组成的张力纤维,直径约 40 nm。张力纤维形态长而直,常常与细胞的长轴平行并贯穿细胞全长。染色时用的 M 缓冲液,其中咪唑是缓冲剂,EGTA 和 EDTA 螯合 Ca^{2+} , 溶液中提供 Mg^{2+} , 在此低钙条件下,骨架纤维保持聚合状态并且较为舒张。

【实验目的】

1. 了解细胞骨架的结构特征。
2. 掌握去垢剂抽提制备细胞骨架的技术。
3. 制备并观察贴壁生长的动物细胞的张力纤维(肌动蛋白纤丝束)。

【教学安排】

学生可在教师指导下完成本实验。贴壁生长的细胞由实验教师前一天在35 mm的培养皿中铺好单层,上课时每1~2名学生处理一个培养皿。

【材料、试剂与仪器】

1. 实验材料

传代培养的贴壁细胞系 HeLa 或 CHO。

2. 实验试剂

(1) 透化液 1% Triton X-100/M 缓冲液(50 mmol · L⁻¹ 咪唑, pH 6.7; 50 mmol · L⁻¹ KCl; 0.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂; 1 mmol · L⁻¹ EGTA; 0.1 mmol · L⁻¹ EDTA; 1 mmol · L⁻¹ 巯基乙醇; 4 mmol · L⁻¹ 甘油)。

(2) 0.2% 考马斯亮蓝 R250 其溶剂为 46.5 mL 甲醇, 7 mL 冰醋酸, 46.5 mL 蒸馏水。

(3) PBS 800 mL 水中溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄; 用浓 HCl 调 pH 至 7.4, 定容 1 000 mL, 存于室温。

(4) 3% 戊二醛 pH 7.0, PBS 配制。

3. 实验仪器

35 mm 的培养皿, 2 mL 或 5 mL 移液管, 倒置显微镜。

【方法与步骤】

1. 实验前一天按 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞/培养皿的数量将细胞接种于 35 mm 的培养皿中。
2. 实验时, 移去培养基, 用 PBS 洗一遍, 然后加入透化液, 室温中处理 20 min。
3. 吸去透化液, 用不含 Triton X-100 的缓冲液(骨架稳定缓冲液、M 缓冲液)清洗 3 次, 每次 10 min。
4. 3% 戊二醛固定, 15 min。
5. 用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。
6. 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染色 15~20 min。
7. 用 PBS 清洗 2~3 次, 每次 5 min。
8. 倒置显微镜下观察。

【结果与讨论】

普通光学显微镜 40 倍物镜下, 可观察到细胞内细胞核是染色最深的部位, 它的周围是被染成蓝色的蛛网状的张力纤维, 其中较粗大者多与细胞长轴相平行。观察张力纤维的分布特点, 绘制或拍摄所观察到的细胞张力纤维图像(图 1-2)。

【注意事项与建议】

用移液管移除培养皿中液体或加液时,小心不要碰到平皿底部细胞单层,以免破坏细胞及细胞骨架影响观察结果。

【思考题】

1. 如果分别用细胞松弛素 B ($3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或秋水酰胺 ($0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 37°C 下处理培养细胞 30 ~ 60 min, 然后进行上述实验, 各会有什么样的结果?
2. 考马斯亮蓝 R250 是张力纤维的特异性染料吗?

参考文献

- [1] 章静波. 细胞生物学使用方法与技术. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [2] 杨汉民. 细胞生物学实验. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.

(巴雪青、高 杨)

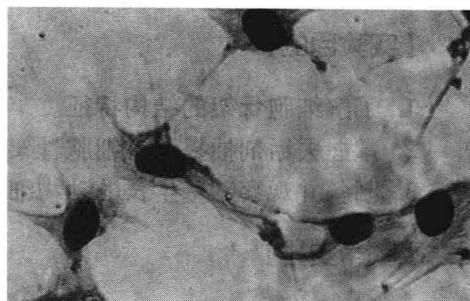


图 1-2 大鼠心肌细胞 H9C2 的细胞骨架染色观察

1-3 液泡系、线粒体的活体染色与观察

【背景与原理】

活体染色是指对生活有机体的细胞或组织能着色, 但对细胞又无毒害的一种染色方法。目的在于显示生活细胞内的某些天然结构, 而不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学变化以至引起细胞的死亡。活体染色技术可用来研究生活状态下的细胞的结构和生理、病理特征。

根据所用染色剂的性质和染色方法的不同, 通常把活体染色分为体内活染与体外活染两类。体内活染是以胶体状的染料溶液注入动、植物体内, 染料的胶粒固定、堆积在细胞内某些特殊结构里, 达到易于识别的目的。体外活染又称为超活染色, 它是由活的动、植物分离出部分细胞或组织小块, 以染料溶液浸染, 染料被选择固定在活细胞的某种结构上而显色。活体染色染料之所以能固定、堆积在细胞内某些特殊的部分, 主要是染料的“电化学”特性起重要作用。碱性染料的胶粒表面带阳离子, 酸性染料的胶粒表面带有阴离子, 而被染的部分本身也是具有阴离子或阳离子, 这样, 它们彼此之间就发生了吸引作用。但不是任何染料皆可以作为活体染色剂用, 应选择那些对细胞无毒性或毒性极小的染料, 而且总是要配成较稀的溶液来使用。

一般是以碱性染料最为适用, 可能因为它具有溶解在类脂质(如卵磷脂、胆固醇等)的特性, 易于被细胞吸收。詹纳斯绿 B (Janus green B) 和中性红(neutral red)两种碱性染料是活体染色剂中最重要的染料, 对于线粒体和液泡系的染色各有专一性。

液泡是植物细胞内浓缩产物的场所, 有十分重要的功能。中性红(neutral red)是液泡的特殊

染色剂,只将液泡染成红色。在细胞处于生活状态时,细胞质和细胞核不被中性红着色。

线粒体是细胞内的一个重要细胞器,是细胞进行呼吸作用的场所。詹纳斯绿 B 对线粒体具有专一性的染色,是毒性最小的碱性染料。詹纳斯绿 B 染色是由于线粒体中的细胞色素氧化酶系的作用,使染料始终保持氧化状态,呈蓝绿色,而周围的细胞质中的染料被还原为无色的色基。

【实验目的】

1. 学习细胞活体染色的相关原理。
2. 掌握一些细胞器的超活染色技术。
3. 观察动、植物活细胞内线粒体、液泡系的形态、数量与分布。

【教学安排】

本实验是基础实验,学生可在教师指导下独立完成。因为实验材料容易获得,所以本实验每位学生都可以独立完成全部制样过程并观察。

【材料、试剂与仪器】

1. 实验材料

口腔上皮细胞,洋葱鳞茎,小麦种子。

2. 实验试剂

(1) Ringer 溶液 8.5 g NaCl, 0.12 g CaCl_2 , 0.20 g NaHCO_3 , 0.14 g KCl, 0.01 g Na_2HPO_4 , 2.0 g 葡萄糖,加蒸馏水至 1 000 mL。

(2) $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1/3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的中性红溶液 称取 0.5 g 中性红溶于 50 mL Ringer 溶液,稍加热($30 \sim 40\text{ }^\circ\text{C}$)使之很快溶解,用滤纸过滤,此为 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的中性红溶液。装入棕色瓶于暗处保存,否则易氧化沉淀,失去染色能力。临用前,取 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的中性红溶液 1 mL,加入 29 mL Ringer 溶液混匀,即成 $1/3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液,装入棕色瓶备用。

(3) $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的詹纳斯绿 B 溶液 称取 0.5 g 詹纳斯绿 B 溶于 50 mL Ringer 溶液中,稍加热($30 \sim 40\text{ }^\circ\text{C}$)使之很快溶解,用滤纸过滤,即为 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的詹纳斯绿 B 溶液。临用前,取 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的詹纳斯绿 B 溶液 1 mL,加入 49 mL Ringer 溶液混匀,即成 $0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液,装入棕色瓶备用,避免氧化。

3. 实验仪器

单面刀片,滤纸,镊子,牙签,载玻片,盖玻片,水浴锅,显微镜。

【方法与步骤】

1. 植物细胞液泡的活体染色

撕取洋葱鳞茎内表皮,放在加有一滴 $1/3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 中性红溶液的载玻片上,染色 $5 \sim 10\text{ min}$ 。

用吸水纸吸去中性红溶液,换上 Ringer 溶液,盖上盖片,显微镜下观察,可见到被染成红色的中央大液泡。

2. 小麦根尖细胞液泡系的中性红染色观察

实验前,把小麦种子培养在潮湿滤纸上,使其发芽,胚根伸长至 1 cm 以上。用双面刀片将根