

细胞与 分子生物学 实验指南

Xibao Yu Fenzi Shengwuxue
SHIYAN ZHINAN

伍会健 唐颖 主编



大连理工大学出版社

细胞与 分子生物学 实验指南

主编 王德成 副主编 王德成 王德成
副主编 王德成 王德成 王德成

清华大学出版社

清华大学出版社

细胞与分子生物学实验指南

伍会健 唐颖 主编

大连理工大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞与分子生物学实验指南 / 伍会健, 唐颖主编.
— 大连 : 大连理工大学出版社, 2011. 7
ISBN 978-7-5611-6376-4

I. ①细… II. ①伍… ②唐… III. ①细胞生物学—
实验—高等学校—教学参考资料 ②分子生物学—实验—高
等学校—教学参考资料 IV. ①Q2-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 149830 号

大连理工大学出版社出版

地址:大连市软件园路 80 号 邮政编码:116023

发行:0411-84708842 邮购:0411-84703636 传真:0411-84701466

E-mail:dutp@dutp.cn URL:<http://www.dutp.cn>

大连美跃彩色印刷有限公司印刷 大连理工大学出版社发行

幅面尺寸:170mm×240mm 印张:7.25 字数:168千字
2011年7月第1版 2011年7月第1次印刷

责任编辑:汪会武

责任校对:李雪

封面设计:波朗

ISBN 978-7-5611-6376-4

定 价:15.00 元

前 言

细胞与分子生物学实验技术是现代生命科学技术的主要组成部分,与生命科学的发展息息相关;同时,细胞生物学和分子生物学也是高校生命科学相关专业的重要的基础主干课程。因此,细胞与分子生物学实验课程不但为主干课程教学提供了必不可少的实验环节,而且也使学生能够掌握现代生物学重要的基本研究手段和方法。

细胞与分子生物学实验技术发展很快,这就要求学生不但能够掌握基本的实验技术,同时也要了解与掌握一些前沿的、实用的实验技术,才能适应生命科学技术日新月异的更新与发展。鉴于此,我们编写了这本实验指导教材,目的在于让学生在掌握基本技术的基础之上,能够接触和了解更为实用的前沿实验技术。

本书主要包括两个部分。第一部分即前十个实验是细胞生物学实验部分,主要是根据编者多年的实验教学经验和实验教学课程目标的设置而选择了具有代表性的十个实验。它们涵盖了细胞各种常用显微镜的使用技术,细胞培养技术,细胞免疫组化技术,细胞转化技术,等等。这些实验凝聚了编者多年实验教学的实践经验与体会,所以操作性较强。这些实验不但包括细胞生物学基本的技术训练,而且还注重在基本实验中融入综合性、探索性的设计,使学生在科学思维方法和独立解决问题的能力方面得到提高。第二部分即后十个实验是分子生物学实验技术,主要是根据编者长年从事分子生物学科学研究而积累的丰富的科研经历,选择了近些年来发展起来的较为实用而前沿的分子生物学技术,它们包括免疫共沉淀、GST Pull-down Assay、DNA 甲基化、凝胶迁移实验、RNA 干涉等等。而分子生物学基本的实验技术也通过编者用心的实验设计而很好地融入了这些前沿的实验技术中,这一点和绝大多数已出版的只介绍分子生物学基本的传统技术的实验指导是不同的。而这些前沿技术已在现代分子生物学研究中越来越普遍地被使用。这些较为前沿的实验技术中很多内容在现有的出版物中是很难找到的,无疑本书是了解这些前沿技术的有意义的参考资料,同时所设置的实验训练不但开阔了学生的视野,而且也使学生能够更好地适应生命科学技术发展的需要。

本书可供大专院校生命科学相关专业的教师和学生作为教学参考书使用,也可供从事相关专业研究的教师和学生参考。

由于编者的水平有限,本书难免存在缺点和错误,恳请广大读者批评指正。

伍会健 唐颖
2011年3月

目 录

实验一	细胞形态结构的光学显微镜观察	1
实验二	动物细胞微丝、中间纤维的显微观察	9
实验三	植物细胞染色体标本的制作与观察	16
实验四	动物细胞染色体标本的制作及 G 带显带技术	19
实验五	动物细胞的传代培养	23
实验六	动物细胞的原代培养	29
实验七	动物培养细胞生长曲线的测定	34
实验八	植物的组织培养技术	38
实验九	细胞凋亡的形态学观察及流式细胞技术检测	43
实验十	电击法转化 GFP 基因于盐藻细胞	49
实验十一	Western blot 实验检测 p53 蛋白在不同分裂时期的细胞中的表达	52
实验十二	RNA 的提取及 Northern 杂交	57
实验十三	免疫共沉淀检测 p21 和 PCNA 两种蛋白的相互作用	62
实验十四	GST Pull-down Assay 检测 ISL-1 与 BETA2 两种蛋白的相互作用	66
实验十五	亚硫酸氢钠法检测 DNA 甲基化	70
实验十六	动物细胞脂质体转染及荧光素酶检测	73
实验十七	利用凝胶迁移实验(EMSA)分析基因表达调控作用元件	76
实验十八	染色质免疫共沉淀技术	81
实验十九	RBP-Pull Down 技术	85
实验二十	RNA 干涉实验技术	88
附 录	93
参考文献	104

实验一 细胞形态结构的光学显微镜观察

显微镜技术是细胞生物学研究的基础。随着科学技术的发展,现代显微镜生物技术也在不断进步。除了最为常见的明视野光学显微镜之外,又相继出现了暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、荧光显微镜、偏光显微镜、电子显微镜、激光扫描共聚焦显微镜等。这些先进的显微镜技术使人们对于细胞神秘的微观世界了解得越来越细致。本实验主要是熟悉和巩固最为常用的明视野显微镜的用法,并掌握一些生物临时标本的制备方法。

1 实验背景与原理

1.1 科勒照明:光学显微镜的一般原理

科勒照明系统(Köhler Illumination)是由德国的动物学家 August Köhler 于 1893 年发明的。相对于传统的临界照明(critical illumination),科勒照明系统在样品的视野范围内减少了内部散射光,控制了反差和深度,更有效地提供了中心亮视野照明。

1.1.1 光学显微镜的基本构造

光学显微镜的基本结构包括机械、照明和光学三部分(图 1-1、表 1-1)。显微镜的放大作用是由物镜和目镜共同完成的。标本经物镜放大后,在目镜的焦平面上形成一个倒立的实像,再经目镜的进一步放大形成一个虚像,被人的眼睛所观察到。每台显微镜一般有 3~4 个物镜,可分为低倍镜(如 $4\times$ 、 $10\times$),高倍镜(如 $40\times$)和油镜($100\times$)。目镜通常有 $5\times$ 、 $10\times$ 和 $15\times$ 三种。目镜只起放大作用,而物镜决定显微镜的分辨率。物镜外壳上通常标有放大倍数、数值孔径、镜筒长、盖玻片的厚度和使用条件等性质参数。如标有“oil, N. A. 1.30, $100\times$, 160/0.17”的物镜表示数值孔径为 1.30,放大倍数为 100 倍的油镜,其要求镜筒长为 160 mm,盖玻片的厚度为 0.17 mm。数值孔径(numerical aperture)是决定显微镜分辨率的最重要参数。

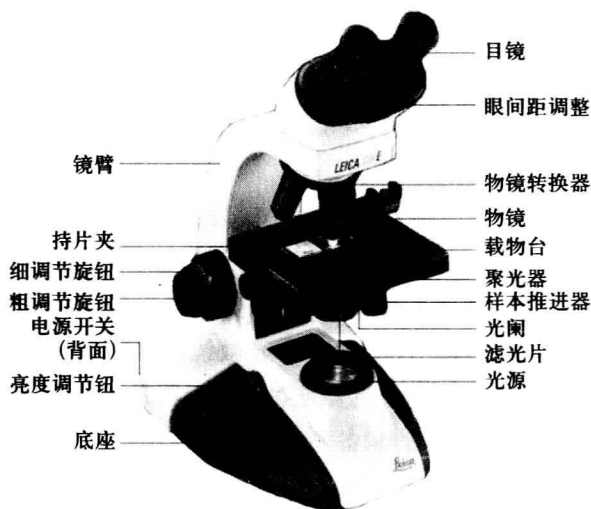


图 1-1 LEICA EME 型生物显微镜的构造

(http://www.gsau.edu.cn/)

表 1-1 显微镜的基本结构

显微镜部分	具体部件名称
机械部分	镜座、镜柱、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、调节器
照明部分	光源部分(反光镜或电光源)、聚光器
光学部分	物镜、目镜

1.1.2 显微镜的分辨率

(1) 瑞利极限(Rayleigh limit): 光学显微镜的最大分辨率为 $0.2 \mu\text{m}$ 。根据瑞利极限计算显微镜的分辨率如下式:

$$d = 0.61\lambda / \text{N. A.} \quad (\text{N. A.} = n \cdot \sin \theta)$$

式中, d 为分辨率, 单位 μm ; λ 为照明光线的波长; N. A. 为数值孔径; n 为介质的折射率; θ 为物镜镜口角的一半的角(镜口角是通过样品的光线延伸到物镜光孔边缘所成的角)。

从式中可见, 可通过缩短使用光波长或增加数值孔径来提高分辨率。电子显微镜的光源是可见光波长十万分之一的电子束, 所以其分辨率可达 $0.2 \sim 0.3 \text{ nm}$ 。可见光的光波幅度比较窄, 紫外光波长短可以提高分辨率, 但不能用肉眼直接观察, 所以利用减小光波长来提高光学显微镜分辨率是有限的。从公式中可知: 提高数值孔径有两种方法, 一是增大镜口角, 二是增大物镜与标本之间的折射率。采取前一种方法时, 可以让标本与物体尽量靠近。但无论怎样靠近, 镜口角总是小于

180° , $\sin \theta$ 总小于 1。采取后一种方法时,可在物镜与标本之间加入折射率较大的介质。当空气为介质时折射率为 1,而香柏油的折射率为 1.51,和载片玻璃的折射率(1.52)相近,这样光线可以不发生折射而直接通过载片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率。因此,油镜的数值孔径较大,分辨率较高。

(2)显微镜的放大率:显微镜的总放大率一般为物镜与目镜放大倍数的乘积。总放大率要和数值孔径匹配,应在 500~1000 N. A. 值之间,此为有效放大范围。

(3)照明系统对分辨率的影响:聚光器是照明系统中的重要部件,调节不当不但可影响照明的均匀性,还会降低显微镜的分辨率,直接影响图像的反差。因此,在使用显微镜观察标本前,首先需要调节照明系统,主要通过聚光器的调节,控制光线照明物体的光锥角度,以得到最佳的分辨率和反差。

1.1.3 显微镜的使用方法

(1)调节照明系统:通过调节光亮调节器、聚光器的上下位置及虹彩光圈(孔径光阑)使视野内的光线均匀,亮度适中。因其最佳调节很大程度上取决于标本固有的反差特征,所以在观察标本时还要随时调整照明系统,以达到最佳效果。当照明光束与显微镜的光轴不在同一轴线上时,还需通过调节聚光器中心调节旋钮进行合轴调节(centering adjustment)。调好后,不要再随意调节中心调节旋钮。

(2)低倍镜观察:将标本片固定在载物台上,用标本夹夹住,移动推进器使观察对象处在物镜的正下方。旋转转换器,将低倍物镜调至光路中央。旋转粗调节旋钮将载物台升起,从侧面注视小心调节物镜接近标本片约 5 mm 处,然后用目镜观察,慢慢下降载物台,直至视野中出现清晰的图像为止。

(3)高倍镜观察:在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心,轻轻转动物镜转换器,将高倍镜移至工作位置。调节照明系统后微调细调节旋钮使物像清晰。

(4)油浸镜观察:在高倍镜或低倍镜下找到要观察的样品区域,先用粗调节旋钮下降载物台,然后将油浸镜转到工作位置。在待观察的样品区域加一滴香柏油,从侧面注视,用粗调节旋钮将载物台小心地上升,使油浸镜浸在香柏油并几乎与标本片相接触。将聚光器升至最高位置并开足光圈,慢慢地下降载物台至视野中出现清晰图像为止。

(5)使用后的整理:下降载物台,取下载玻片,转动转换器使物镜与通光孔错开。下降聚光器,以免物镜和聚光器发生碰撞危险。关闭光圈,关闭开关,拔掉插头。有些显微镜有内置蓄电池,故即使拔掉插头也一定要关闭开关。

(6)使用中的注意事项:

① 养成良好习惯。比如要双目观察;转换物镜时要轻轻转动转换器,不要扳着物镜转动等等。

② 制作目镜上的指示针。在演示或考查学生观察效果时,最好用带有指示针的目镜。简易的做法是:轻轻拆开目镜,将一根短头发的一端用胶水粘在目镜内侧的边缘,另一端指向目镜的圆心附近。观察时,轻轻地转动目镜,指示针就能够指出视野内的不同部位。

③ 要用擦镜纸擦拭物镜和目镜。用完油浸镜后用擦镜纸拭去镜头上的油,然后用擦镜纸蘸少许二甲苯(或乙醚:无水乙醇=1:1)擦去镜头上残留的油迹,最后再用干净的擦镜纸擦去残留的清洁液。

1.2 光学显微镜临时标本的制备

生物材料必须经过处理,分离成单个细胞或薄片,使光线透过,才能在显微镜下观察其结构,这就产生了光学显微镜的制片技术。从制片保存时间来分,有临时制片和永久制片;制片方法又有切片法和非切片法之分。表 1-2 显示了常用的临时制片方法。切片法最简单的是徒手切片法。若组织块过于柔软,切削困难,就必须先用某种物质包埋组织块,再用精密的切片机制作切片。根据包埋剂不同又分为石蜡切片、超薄切片(包埋剂为环氧树脂)、火胶棉切片等。其中石蜡切片是最常用的。临时制片如有保存的必要,可用化学试剂进行固定、洗涤、染色、脱水、透明处理、封藏等一系列处理步骤,才可制成永久制片。

表 1-2 常用的临时制片方法

方法	非切片法		切片法
	适用性		
涂片法	血液、精液、微生物等无固定组织结构的样品		
铺片法	动植物组织的表皮层		切片法:徒手切片、石蜡切片、超薄切片、火胶棉切片、冰冻切片等
压片法	幼嫩、柔软的材料		
整装片法	原生动物、微藻等		
滴片法	细胞悬液		

由于组织或细胞的许多结构在自然状态下是无色或浅色的,不易观察,通常选用合适的一种或多种染料和细胞内含物发生物化反应,使特定观察部位着色,增加标本的反差以达到更佳观察效果。比如最常用的苏木精-伊红(HE)染色就是利用苏木精和伊红分别是细胞核和细胞质的优良染料来增加组织细胞结构各部分的反差。

2 实验目的

- (1) 熟悉显微镜的工作原理及使用方法。
- (2) 了解光学显微镜下细胞和细胞器的形态结构特点。
- (3) 了解一些细胞器的活染原理及方法。
- (4) 掌握常用的临时制片的方法。

3 实验材料与试剂

(1) 材料: 马铃薯, 番茄, 菠菜, 芹菜, 盐藻, 生物标本永久制片。

(2) 设备与用品: 普通光学显微镜, 异物针, 镊子, 刀片, 培养皿, 滴管, 载玻片, 盖玻片, 滤纸, 擦镜纸, 毛笔, 牙签等。

(3) 药品与试剂: 香柏油, 乙醚, 乙醇, 碘, 詹纳斯绿, 瑞氏粉, 甲醇等。

试剂配制:

• 碘液: 2 g KI 溶于 5 mL 水中, 再加 1 g I_2 补齐至 300 mL。棕色瓶中避光 4 °C 下保存。

• 0.3 g · L⁻¹ 詹纳斯绿 B 溶液: 0.03 g 詹纳斯绿 B 溶于 100 mL 生理盐水 (9 g/L NaCl) 中。棕色瓶中保存, 现用现配, 不宜保存过久。

• 瑞氏 (Wright) 染液: 瑞氏粉 0.1 g 加 60 mL 甲醇研磨溶解, 存于棕色瓶中, 一周后使用。密封保存可长期使用。

4 实验方法与步骤

• 实验内容:

- ① 生物标本永久制片的观察;
- ② 新鲜材料的临时制片及观察。

• 实验学时:

4 学时

(1) 通过观察一些生物标本的永久制片, 熟悉显微镜的使用。

(2) 临时制片的制备和观察

① 番茄果肉离散细胞及有色体的观察

用解剖针挑取少许成熟的番茄果肉, 置于载玻片上的清水滴中。先用解剖针将果肉细胞剥离开来, 再加盖玻片, 制成临时装片。(图 1-2)

② 马铃薯块茎细胞及淀粉粒的观察

用刀切下一条马铃薯,用徒手切片法切下一薄片。切片时力量要均匀,从自己的前方向后拉切,用手臂的力量而不是手腕用力,这样才好控制拉切的力道。整个过程中随时保持材料和刀面的湿润,否则材料容易破损。将切下薄片的刀片浸到装有清水的培养皿中,切片即漂浮于水中。也可用润湿的毛笔粘取切下的薄片。

先将薄片于清水滴中观察。再在盖玻片一端滴加碘液,另一端放置滤纸,使碘液渗入盖玻片中,染色少许观察细胞中的淀粉粒,仔细观察会看到淀粉粒上的偏心轮纹(图 1-3)。

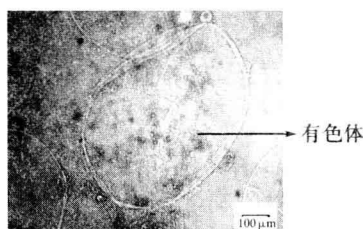


图 1-2 番茄有色体($\times 100$)(唐颖等)

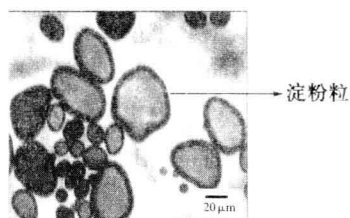


图 1-3 马铃薯的淀粉粒($\times 400$)(唐颖等)

③ 菠菜叶片细胞及叶绿体、气孔的观察

将叶子对折,用镊子撕下一小块带有一点叶肉的下表皮,制成临时装片。叶片较薄不容易撕取时,也可以用手撕裂叶片,取撕裂边缘处较薄的下表皮。观察表皮细胞、叶绿体、气孔等结构。

④ 盐藻细胞的观察

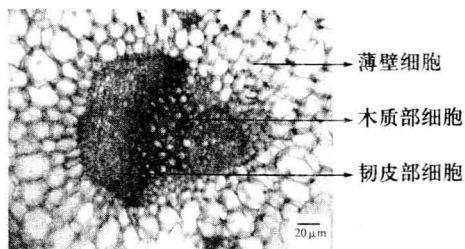
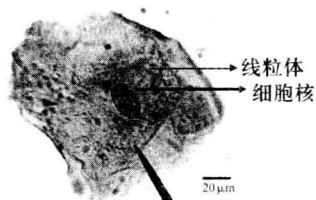
将盐藻滴加到载玻片上,盖上盖玻片直接观察。盐藻因为含有叶绿体而呈现绿色。因为有鞭毛,可见到其在液滴中游动的情形。

⑤ 芹菜茎横切维管束等结构的观察

用徒手切片法切下芹菜茎的横切薄片,分别在低倍镜和高倍镜下观察芹菜茎的木质部、韧皮部、薄壁细胞、厚角细胞等结构。(图 1-4)

⑥ 线粒体活体染色观察

在载玻片中央滴一滴 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 詹纳斯绿 B 染液,用牙签在口腔面颊部刮取细胞,均匀涂于詹纳斯绿 B 溶液中,染色 $1 \sim 3 \text{ min}$,制成人口腔黏膜上皮细胞的临时涂片。詹纳斯绿 B 可专一性地对线粒体进行活染,这是由于线粒体内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,可见颗粒状或棒状的线粒体。(图 1-5)

图 1-4 芹菜茎横切($\times 400$)(唐颖等)图 1-5 人口腔黏膜上皮细胞线粒体的分布($\times 400$)(唐颖等)

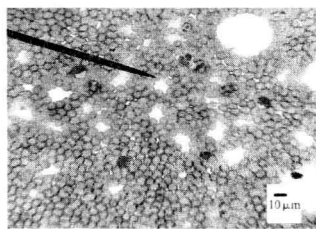
⑦ 人血涂片制备

从指腹或耳垂取第二滴血(第一滴血因含白细胞过多,挤去)滴加于载玻片一端。另拿一干净载玻片,其窄边接触样品,使其在两载玻片接触处展成线状。以约 45° 角轻推载玻片,使样品展成一薄层血膜(图 1-6)。注意推片动作要连贯,血片的厚度依血滴大小、推片速度和两片夹角而定。血滴小,速度慢,夹角小则血片薄。待血片晾干后,滴加瑞氏染液染色 5 min,再滴加等量清水静置片刻,冲去染液,晾干观察。

油镜下,红细胞呈圆盘状,中央薄,无核,着色浅,数量多;白细胞多为胞质淡蓝色,核为深蓝或紫色;白细胞核形态多样,有叶形、肾形或圆形等,颜色也因为酸碱性质不同而深浅不一。血小板染成紫红色,不规则。(图 1-7)



图 1-6 涂片方法示意图

图 1-7 人血涂片($\times 100$,唐颖等)

(3) 选取芹菜茎横切及另一自选生物标本绘图。

生物绘图的要求及注意事项如下:要选用 HB 和 3H 铅笔;要有标题、标注及放大倍数,比例要合适;注图线用平行直线或折线引出,不能交叉;用圆点的疏密反映标本的反差,不能使用阴影、斜线等;不要画视野光圈。

5 实验注意事项

(1)切片中重要的是切下一小片平而薄的组织,并不追求切下一个完整的切片。

(2)观察中除了要注意对细胞基本形态结构的观察外,还要注重这些新鲜材料的制作标本各自不同的特殊结构的观察。

(3)加盖盖玻片时,应防止产生气泡。

(4)有精力的学生也可采集自己感兴趣的软硬适度的材料进行观察。

6 思考题

(1)显微镜镜头上的数字都代表什么意义?其中 N. A. 值有什么重要意义?油镜的 N. A. 值为什么大?

(2)制作人口腔黏膜上皮细胞的临时涂片时,先将细胞涂于清水滴中观察,之后再行染色,可否得到理想效果,为什么?

(3)试从叶片的结构解释为什么取菠菜下表皮观察?观察叶绿体时,为什么要将叶肉面朝上?

(4)根据自己的实践总结一下如何成功做好光学显微镜的标本。

(5)通过实验的观察,思考细胞结构和功能的关系。

实验二 动物细胞微丝、中间纤维的显微观察

细胞骨架是真核细胞中由蛋白质纤维组成的复杂网络结构。它不但如同细胞的骨骼一样起着支持和运动的功能,并且与细胞的分化、信息传递、基因表达等多种细胞生命过程息息相关。观察细胞骨架的主要手段有电镜法、组织化学染色、免疫荧光技术等。本实验介绍常用的组织化学和间接免疫技术观察细胞骨架的方法。通过本实验也可了解和掌握免疫组织化学的一般方法。

1 实验背景与原理

1.1 荧光显微镜的原理和使用方法

荧光是由化学物质吸收短波长光受激发后,释放能量回到基态时所发射的较长波长的光。有的荧光是自发荧光,像叶绿素、血红素等经紫外线照射后,发出的红色荧光,称为自发荧光;还有一种是诱发荧光,即物体经荧光染料染色后再通过短波长照射发出的荧光,称为诱发荧光。荧光显微镜(Fluorescence Microscopy)即是利用荧光来观察和定位产生荧光物质的细胞结构的显微镜,在共聚焦显微镜和多光子荧光显微镜这些最为先进的显微镜中都要用到荧光。荧光显微镜分为透射式和落射式两种,这里主要介绍最常用的落射式荧光显微镜。

1.1.1 荧光显微镜各部分的组成及其功能

(1)光源:常用光源为高压汞灯或氙灯。根据所用荧光物质的吸收(激发)峰的位置来选择最佳的光源。它们都能发射紫外、蓝光、绿光等短波长的强光。

(2)滤色系统:主要包括激发滤光片、光束分色镜(又称双色反射镜)和阻断滤光片,是荧光显微镜的主要部件(图 2-1)。荧光物质在特定波长处有最大的吸收峰和发射峰,因此,激发滤光片的作用即是从汞灯的全色光中滤出激发样品所需的单色光。激发滤光片一般有紫外、蓝光、绿光三种。阻断滤光片的作用是使激发光和荧光分离,即阻断激发光而使波长长于激发光的荧光通过。因此,一种阻断滤光片需与其相应的激发滤光片组合使用。另外,在光路中与激发光方向呈 45° 的位置还安装光束分色镜,起着初步分离激发光和荧光的作用,即激发光可被反射到样品上,而产生的荧光则被透过进入到目镜中(图 2-1)。

(3)物镜与目镜:荧光显微镜的物镜是能透过紫外光的特制物镜,荧光效率与物镜的数值孔径的 4 次方成正比;目镜一般有 $5\times$ 、 $6.3\times$ 、 $10\times$ 等几种,而荧光亮度

与目镜放大倍数的平方成反比,故可采用高数值孔径物镜和较低倍目镜观察。

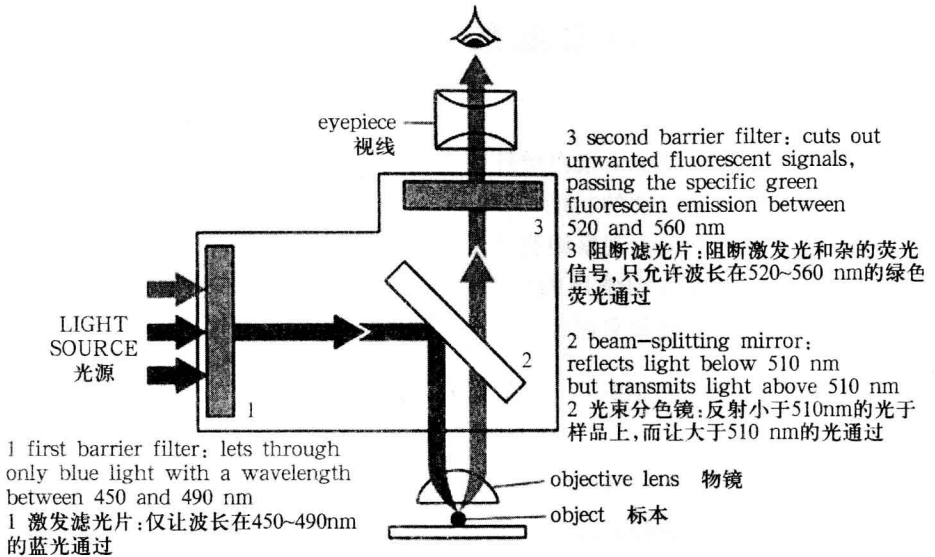


图 2-1 落射式荧光显微镜的光路组成

(选自 The Art of MBOC(3), 1995 Garland Publishing Inc.)

1.1.2 荧光显微镜的使用方法

(1)启动高压汞灯:一般需预热几分钟待汞灯稳定后方可观察。首次使用,应根据说明书调节灯位中心。

(2)根据标本选择合适的激发滤光片和阻断滤光片。

(3)观察:可先关闭阻断挡板,在可见光下调焦,直至清晰地观察到目标部位。再打开阻断挡板,在荧光光路下进一步调焦,直至观察到清晰的荧光图像。

1.1.3 注意事项

(1)现在光源多用汞灯,开启后,汞灯需待灯内水银完全蒸发,产生光量子才能工作。所以使用中要尽量减少开启汞灯的次数,才可延长汞灯的使用寿命。开启灯后也不可立即关闭,以免因水银蒸发不完全而损坏电极,一般需开启 15 分钟以上才可关闭。关闭后也要等 15 分钟以上待灯完全冷却才可重启。另外,一次使用的时间也不要超过 2~3 小时,否则会影响观察效果。

(2)灯开启后,温度很高,勿用手触摸灯室,以免灼伤;也不可在灯室上覆盖任何东西,以保持良好的散热。

(3)要尽量减少标本在短波长光下的照射时间,避免荧光淬灭。暂不用荧光观察时,应及时关闭阻断挡板。

(4) 实验中使用的封片剂甘油或油镜观察中使用的油都必须是无荧光的。

1.2 免疫荧光细胞化学技术

免疫细胞化学技术是利用免疫学中抗原、抗体以及补体间的专一性反应,对细胞或组织中特定大分子进行检测的实验技术,为研究细胞或组织的生物大分子提供了特异性强、灵敏度高、易观察又能定性定量进行分析的检测系统。

常用的免疫细胞化学方法有免疫荧光法、免疫酶标法、PAP法(过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物法)、ABC法(抗生物素-生物素-过氧化物酶法)、胶体金法、同位素法等。它们所采用的标记物和显微方法均不同。现已开发出了不少相应的检测试剂盒。

免疫荧光法是将荧光素标记到抗体或抗原上,将其作为分子探针来检测细胞或组织中与其特异结合的相应的抗原或抗体的细胞化学方法。主要分为直接法和间接法。

1.2.1 直接法

将荧光素标记在特异抗体(抗原)上使其直接与细胞或组织中相应的抗原(抗体)结合,再用荧光显微镜观察检测。

1.2.2 间接法

有两对抗原-抗体系统。荧光素标记在第二抗体上,待第一抗体直接与细胞或组织中的抗原结合后,再用标记了的第二抗体与第一抗体特异结合,从而间接检测抗原。所以两对抗原-抗体系统分别为:待测抗原与未标记的第一抗体;第一抗体(作抗原)与标记了的抗第一抗体的抗体(第二抗体)(图 2-2)。



图 2-2 间接免疫荧光法原理示意图

间接法的优势在于:一是由于第一抗体的分子上有多个抗原决定簇,所以大大增强了信号的强度,使灵敏度提高;二是只需制备一种第二抗体就可用于多种抗原的鉴定,所以适用性广,经济而方便。常用的荧光素有异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明等。实验中抗体的稀释度和孵育时间是影响检测效果的最主要因素。

1.3 动物细胞微丝、中间纤维的显微观察原理

根据直径大小,将真核细胞骨架主要分为微丝(Microfilament, MF, 7 nm),微管(Microtubule, MT, 25 nm),中间纤维(Intermediated filament, IF, 10 nm)。