

The background of the cover is a microscopic image showing several cells. Some cells are large and spherical with a granular interior and a distinct outer boundary. Others are smaller and more irregular. The colors are primarily green, brown, and orange, giving it a scientific, biological feel.

细胞生物学

实验

XBSWXS

李玲 李雪峰 编著

湖南科学技术出版社

Hunan science & technology press

Q2-33
L355

细胞生物学 实验 XBSWXS

李玲 李雪峰 编著

湖南科学技术出版社

Hunan science & technology press

1111163/06

细胞生物学实验

编 著:李 玲 李雪峰

责任编辑:刘堤地

出版发行:湖南科学技术出版社

社 址:长沙市湘雅路 280 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系:本社直销科 0731-4375808

印 刷:长沙市芙蓉区育华学校印刷厂

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址:长沙市芙蓉区复兴街 100 号

邮 编:410011

出版日期:2003 年 8 月第 1 版第 1 次

开 本:787mm × 1092mm 1/32

印 张:6

字 数:113000

书 号:ISBN 7-5357-3753-6 /Q · 67

定 价:17.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

细胞生物学是一门以细胞为单位的研究生命活动现象、规律及其本质的科学，它是从细胞整体水平、亚显微结构水平、分子水平来研究细胞结构时空概念上的生命活动规律的。

近几年来，随着细胞生物学学科的迅猛发展，教学内容也随之有了较多更新，细胞生物学被作为主干基础课列入高等院校生命科学各专业的教学计划中，并开设了实验课。为了提高教学水平、反映本学科更具科学性、先进性和实用性的实验内容，编者根据教育部教学大纲的要求和课程的设置，总结多年的教学科研的实践体会，在参阅中外文献、学习兄弟院校的教学经验和信息资料的基础上，编写了《细胞生物学实验指导》一书。

全书分为两部分。第一部分为基础实验，共有 32 个实验；内容包括细胞膜的特性、细胞器的分离、细胞骨架的观察、细胞染色体的分析、细胞生理、细胞电泳、细胞培养、细胞融合、细胞转化、电子显微镜技术等；第二部分为综合实验，共有 8 个实验。学生完成基础实验后，在老师的指导下，以小组为单位，由学生选题，查阅资料，确定研究方案，独立完成相关实验研究，写出规范性实验报告，开展专业技术训练，目的

是初步培养学生科学研究的能力，为开展科学研究和完成毕业论文打下基础。

本书的主编是李玲、李雪峰。参加编写的人员有：李玲、李雪峰、罗虹、施和平、王小菁、宾金华、徐向明、张铭光。

本书是一本实用性强的细胞生物学实验教材，可作为不同实验基础条件的师范院校和综合性大学的本科生及研究生使用。本书编写人员虽然各具相应的专业特长，且都是教学科研第一线的教师，但鉴于知识和能力所限，书中的缺点与错误难免，恳请各位同仁予以批评指正。

华南师范大学生命科学学院

2003年5月

目 录

实验须知	(1)
实验报告的书写	(2)
基础实验	
实验 1 细胞质流动	(6)
实验 2 细胞的活体染色	(8)
实验 3 细胞大小测定	(12)
实验 4 细胞计数	(15)
实验 5 细胞活性检查	(17)
实验 6 叶绿体的分离与荧光观察	(20)
实验 7 线粒体制备与活性鉴定	(23)
实验 8 植物原生质体分离和活性鉴定	(28)
实验 9 细胞骨架的观察	(32)
实验 10 动物细胞微丝束的观察	(34)
实验 11 植物组织培养	(38)
MS 培养基的配制	(38)
培养基灭菌	(43)
植物外植物体消毒和接种	(48)
实验 12 愈伤组织的诱导	(54)
实验 13 愈伤组织的分化	(57)
实验 14 植物细胞悬浮培养	(60)
实验 15 植物原生质体的培养	(63)

实验 16 动物细胞培养液、消化液和 冷冻液的配制·····	(67)
实验 17 小鼠胎儿细胞的原代培养 ·····	(75)
实验 18 小鼠胎儿细胞的传代培养 ·····	(81)
实验 19 培养细胞的纯化 ·····	(86)
酶消化法 ·····	(86)
反复贴壁法 ·····	(88)
实验 20 细胞的染色体观察 ·····	(90)
实验 21 细胞的冷冻保存与复苏 ·····	(94)
实验 22 细胞转化 ·····	(99)
实验 23 细胞吞噬运动的观察 ·····	(103)
实验 24 细胞膜的渗透性 ·····	(106)
实验 25 细胞过氧化物酶定位 ·····	(109)
实验 26 细胞的凝集反应 ·····	(111)
实验 27 诱导细胞融合 ·····	(114)
聚乙二醇法 ·····	(114)
电场法 ·····	(116)
实验 28 染色体早熟凝集实验 ·····	(119)
实验 29 细胞电泳 ·····	(122)
实验 30 凋亡细胞的形态学观察 ·····	(129)
实验 31 凋亡细胞的钙离子浓度测定 ·····	(132)
实验 32 电子显微镜和生物样品的亚 显微结构观察·····	(135)
综合实验	
实验 33 细胞生长曲线的绘制 ·····	(142)
实验 34 不同冷冻保护剂和血清浓度 对细胞冷冻效果的影响·····	(144)
实验 35 细胞器分离纯化和性质研究 ·····	(147)

实验 36 细胞中酶的定位和定性研究	(149)
实验 37 检测细胞凋亡方法	(151)
实验 38 不定根发生的细胞生理学研究	(155)
实验 39 影响植物原生质体融合研究	(157)
实验 40 花卉快速繁殖研究	(160)
附录 1 细胞密实体积 (PCV) 的测定	(163)
方法	(163)
附录 2 离心机转数与离心力的列线图	(164)
附录 3 用血细胞计数板计数细胞的方法	(165)
附录 4 组织培养常用的仪器设备和器具	(167)
附录 5 微孔滤膜过滤除菌方法	(168)
附录 6 常用植物生长物质的理化性质	(170)
附录 7 常用培养基的配方 (单位: mg/L)	(171)
附录 8 动物细胞培养常用的平衡盐溶液配方	(177)
附录 9 用于动物细胞冷冻保存的各种冷冻液	(178)
参考文献	(179)

实验须知

1. 每个学生必须遵守实验室规则。
2. 实验时不准迟到、早退或无故缺席，有病或有事需向任课教师请假。
3. 进入实验室后要保持安静，不得在室内喧哗、打闹；不得抽烟、吃东西、随地吐痰、乱丢纸屑和其他杂物。
4. 不得将与实验无关的物品带入实验室；不得将实验物品带出实验室；不允许在实验台和仪器上乱涂乱画，未经许可不得操作、搬弄仪器设备。
5. 要爱护仪器、设备和标本，使用仪器要小心，严格遵守操作规程，因违反操作规程而损坏仪器设备及物品者要按有关规定赔偿。
6. 在实验过程中仪器设备发生故障或损坏时，应首先切断电源，并立即报告任课教师及时处理。
7. 使用贵重仪器设备，一定要在老师的指导下操作，使用完毕，要进行登记。
8. 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂及传染性强的物品时，应严格操作，注意自我保护。如发生意外应立即报告任课教师，及时处理。
9. 实验完成后，将仪器设备、用具等放归原处，所用器皿清洗干净。值日生负责清扫室内卫生，关好水、电开关和窗户，经任课教师检查后，方可离开实验室。

实验报告的书写

实验报告是对实验观察、比较后所得结果的真实记载，是科学的记录。实验报告的形式可以根据实验内容的不同而分为文字描绘、绘图和列表 3 种形式。

1. 文字描绘：文字描绘是将观察或实验所得结果客观地加以描绘，有时还需要做进一步分析。在此过程中，要抓住主要问题，描绘准确，条理清楚，文字简明。

2. 绘图：将所观察标本的形态结构或显微镜下观察视野图通过作图的方式来表达。

(1) 准备 1 支 3H 和 1 支 HB 黑铅笔及橡皮、直尺、绘图纸和削笔刀。绘图必须真实准确，注意整洁明了。不可抄袭教材或他人的图。

(2) 图的各部分比例应与标本或图像一致，在绘图纸的一面绘图，每幅图的大小、位置必须分配适宜，布局合理。一般较大的图每页绘 1 个，较小的图每页绘数个。

(3) 图的位置一般偏于纸的左侧，右侧作引线及注字。

(4) 绘图时，先用中性铅笔 (HB) 把标本轮廓及主要部分轻轻绘出，然后添加各部分详细结构，再加以修改，最后用尖的硬铅笔 (3H) 以清晰的笔画绘出全图。

(5) 绘图纸上所有的字必须用硬铅笔以楷书写出, 不可潦草。注字引线应水平伸出, 各引线不能交叉, 图的名称应写在图的下面。

3. 制图: 实验报告中可以用图形表达信息。图形有多种, 如曲线图、柱形图、三维图、扇形图等。图形经常表明 2 种变量 (x 和 y) 之间的关系, 2 个数轴是相互垂直的。横轴为横坐标 (x 轴), 纵轴为纵坐标 (y 轴)。通常, x 轴表示自变量 (如处理), y 轴表示因变量 (如生物效应)。每个数轴都要有说明性的标注和合适的测量单位, 每个数轴都要有刻度和参照标记。

4. 制表: 表格通常是简洁、准确、有条理地表示数值型数据的合适方式, 它能有效地压缩和展示实验结果, 并有助于详尽地对数据进行比较。表格包括的内容如下。

(1) 标题: 必要时写上参考标注和日期。

(2) 行和列的表头: 附上合适的测量单位。将相关数据或特性按类别垂直列出, 用行展示不同的实验处理、生物类型等。对照值常放在表格的开头, 相互比较的列要靠在一起。

(3) 数据值: 引用有意义的有效数字, 根据需要列出统计参数。

(4) 脚注: 解释缩写符号、修饰符号及单个细节。

基础实验

实验 1 细胞质流动

【目的】

观察植物细胞质流动现象，了解影响细胞质流动的因素。

【原理】

在多种植物的细胞中都能观察到植物细胞质流动现象，它是细胞活动强弱的重要指标。细胞质流动现象的产生，是细胞骨架中微丝肌动蛋白与肌球蛋白相互滑动的结果，此过程要消耗能量，受各种因素诸如温度、渗透压及各种离子的影响。

【材料】

紫鸭趾草花丝，黑藻（也称水王荇、轮叶黑藻）叶。

【实验用品】

1. 试剂：1 mol/L 氟化钠，1 mol/L 丙二酸钠，0.7 mol/L 2,4-二硝基酚（DPN）。
2. 器具：显微镜，载玻片，盖玻片，尖头镊子，刀片。

【实验步骤】

1. 取 1 块干净的载玻片，在中央滴 1~2 滴蒸馏水；取紫鸭趾草花 1 朵，用镊子取 1 枚雄蕊，迅速置载玻片水滴中，切去花蕊，加盖玻片，用显微镜低倍物镜（10×）进行观察，注意花丝周围附着许多“含珠链”状的花丝毛，每 1 粒“念珠”是 1 个单毛细胞。取黑藻叶用同样的

方法观察。

2. 转换高倍物镜 ($40\times$) 观察, 可以看到细胞质中的颗粒和显著的细胞质, 细胞质之间是液泡, 内含水溶性花青素 (anthocyanin)。注意观察花丝毛细胞核的部位, 哪一个部位见到细胞质流动, 其流动的速度如何。

3. 用吸水纸吸干水, 加 1 滴 1 mol/L 氟化钠, 注意观察细胞质停止流动的时间。细胞质停止流动后, 用吸水纸吸去氟化钠, 滴入清水, 注意流动是否能恢复。

4. 依上述操作, 加 1 滴 1 mol/L 丙二酸钠或 0.17 mol/L 2,4-二硝基酚, 注意观察细胞质流动速度是否发生改变; 用吸水纸吸去药液后, 加入蒸馏水, 再观察细胞质流动的变化。

【实验报告】

1. 绘制紫鸭趾草花丝细胞细胞质流动图。
2. 记录加入各种化学试剂后细胞质流动停止的时间, 并分析原因。

【思考题】

如何理解细胞质流动原理?

(罗 虹)

实验2 细胞的活体染色

【目的】

1. 观察活细胞内线粒体和液泡系的形态、数量与分布。
2. 掌握细胞活体染色技术及观察方法。

【原理】

活体染色是指对细胞或组织在活体状态下进行的一种无毒害的染色方法，可以显示出活细胞内的某种天然结构存在的真实性，不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学变化。

活体染色的机制是染料的堆集。利用染料的“电化学”特性起作用。由于染料（碱性染料）的胶粒表面带有阳离子，酸性染料的胶粒表面带阴离子，而被染部分本身具有阴离子或阳离子，这样，它们彼此之间发生吸引作用，染料就被堆集下来。

活体染料多为碱性染料，如中性红、詹纳斯绿B、次甲基蓝、甲苯胺蓝、亮焦油紫等。活体染料一般具有专一性，例如，中性红染液泡系，詹纳斯绿染线粒体。本实验介绍中性红和詹纳斯绿染活细胞为例。中性红为弱碱性染料，对液泡系（高尔基体）的染色有专一性，只将活细胞中的液泡系染成红色，细胞核与细胞质完全不着色，这可能与液泡中某些蛋白质有关。

【材料】

人口腔上皮细胞，青蛙胸骨剑突软骨细胞，

黄豆根尖细胞。

【实验用品】

1. 试剂:

(1) Ringer 溶液: 在 100 mL 蒸馏水中分别溶解氯化钠 0.85 g (变温动物用 0.65 g)、氯化钾 0.25 g 和氯化钙 0.03 g。

(2) 1% 中性红溶液和 1/3000 中性红溶液: 称取 0.5 g 中性红于 50 mL Ringer 溶液中, 稍加热 (30~40℃) 使其很快溶解, 用滤纸过滤, 装入棕色瓶 (1% 溶液) 于暗处保存, 否则易氧化沉淀, 失去染色能力。临用前, 取已配制的 1% 中性红溶液 1 mL, 加入 29 mL Ringer 溶液混匀, 装入棕色瓶备用, 即为 1/3000 溶液。

(3) 1/5 000 詹纳斯绿 B 溶液: 按实验 3 的方法配 1% 原液, 取其 1 mL 加入 49 mL Ringer 溶液, 即成 1/5000 溶液, 装入瓶中备用。最好现用现配, 以保持充分的氧化能力。

2. 器具: 显微镜, 恒温水浴锅, 解剖盘, 剪刀, 镊子, 双面刀片; 载玻片, 盖玻片, 吸管, 牙签, 吸水纸。

【实验步骤】

1. 口腔黏膜上皮细胞线粒体活体观察:

(1) 取 2 滴 1/5000 詹纳斯绿 B 溶液于清洁的载玻片上。

(2) 用牙签宽头端在自己的口腔颊黏膜处稍用力刮取上皮细胞, 将刮下的黏液状物放到染液滴中, 载玻片放在 37℃ 恒温水浴锅的金属板上染色 10~15 min (注意不可使染液干燥, 必要可再加 1 滴染液), 盖上盖玻片, 用吸水纸吸去四周溢出的染液。