



普通高等教育农业部“十二五”规划教材  
全国高等农林院校“十二五”规划教材

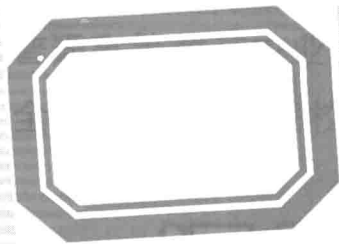
# 细胞生物学实验教程

XIBAO SHENGWUXUE  
SHIYAN JIAOCHENG

周竹青·主编



 中国农业出版社



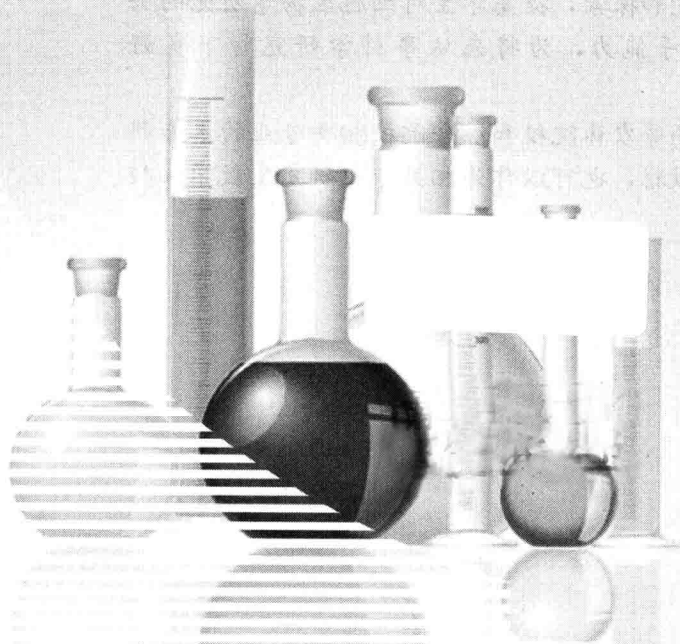
部“十二五”规划教材

“十二五”规划教材

# 细胞生物学

## 实验教程

周竹青 主编



中国农业出版社



## 图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验教程 / 周竹青主编. —北京: 中国农业出版社, 2013. 12

普通高等教育农业部“十二五”规划教材 全国高等农林院校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-109-18621-7

I. ①细… II. ①周… 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 (2013) 第 276792 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 刘 梁

---

北京中兴印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行  
2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月北京第 1 次印刷

---

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 10.5

字数: 180 千字

定价: 19.80 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



## 内 容 简 介

细胞生物学实验是整个细胞生物学教学的重要组成部分。

本教材分为下列几个部分：①细胞生物学实验仪器，介绍的设备包括各种光学显微镜、生物电子显微镜和一些细胞生物学常用设备等。②细胞生物学验证性实验，包括细胞和细胞器的显微结构及超微结构观察、细胞有丝分裂、细胞膜的渗透性和细胞凝聚反应、细胞电泳和细胞吞噬运动观察等共计7个实验。③细胞生物学综合大实验，共设置了细胞器的分离、显微细胞化学技术、超微细胞化学技术、动物细胞培养和植物细胞培养5个综合大实验。每个综合大实验下面设置了若干个关系密切的子实验，方便学生掌握和熟悉相关知识和实验技能，做到举一反三。教师可根据实验条件和学时数对实验内容进行取舍。④细胞生物学创新性实验，共设置了细胞凋亡的诱导、检测与功能研究和细胞骨架观察与功能研究2个大实验。每个项目下面也设置了若干个关系密切的实验内容。方便学生围绕相关实验开展自由研究和探索，提高学生对细胞生物学研究的兴趣，锻炼学生的动手能力，为将来从事科学研究打下良好基础。

本教材可作为高等农林院校和综合院校相关专业的本专科生细胞生物学实验教材，也可以作为相关专业研究生教学和科研的参考书籍。

## 编写人员

主 编 周竹青

副主编 李运广 王 惠 范楚川 杨洪兵

匡银近

编 者 (按姓名笔画为序)

王 惠 邓祥宜 匡银近 齐迎春

李运广 李继伟 杨 莉 杨文丽

杨洪兵 范楚川 周竹青 徐秋涛

谢婷婷 蔡静桐

# 前 言

近年来，细胞生物学学科迅猛发展，教学内容更新较快。细胞生物学已被作为主干基础课列入了高等农林院校各专业的教学计划中，有些院校甚至将细胞生物学实验单独作为一门课程开出。细胞生物学实验是整个细胞生物学教学的重要组成部分，与课堂讲授的理论知识密切相关。通过细胞生物学实验的学习和实践，能使学生了解细胞生物学知识和理论的由来。通过具体的实验操作，能使学生掌握细胞生物学的基本实验方法和技能，锻炼学生的动手能力和科学思维能力，为独立从事科学研究工作打下坚实基础。

本教材被列为普通高等教育农业部“十二五”规划教材、全国高等农林院校“十二五”规划教材。

本教材希望将细胞生物学新的科研成果和研究方法融入到教学内容中，拓宽学生知识的深度和广度。教材内容包括实验仪器原理及使用、验证性实验、综合大实验和创新性实验等几个部分。通过实验仪器和设备介绍，使学生对细胞生物学实验设备有一个感性认识，增长见识；通过验证性实验，使学生能掌握细胞生物学的基本实验方法和技能，锻炼学生的动手能力，同时了解细胞生物学知识和理论的由来；通过开设综合大实验，培养学生观察、比较、分析和综合思维能力，以及实事求是的科学作风；通过开设创新性实验，培养学生科技创新能力和素质。希望该教材的出版能为细胞生物学实验教学改革和进一步提高农林院校细胞生物学实验教学水平做出贡献。全书共包括24个实验，其中5个综合大实验和2个创新性实验又由若干个密切相关的子实验组成。教师可以根据本校实验课开设条件、教学计划学时数和培养目标，对教材内容有选择性地取舍，找到最适合本校特色的教学方案。



参加教材编写的教师有华中农业大学周竹青、李运广、范楚川、谢婷婷、齐迎春；沈阳农业大学王惠；青岛农业大学杨洪兵；湖北工程学院匡银近；华中农业大学楚天学院李继伟、邓祥宜。华中农业大学生命科学技术学院研究生徐秋涛、杨文丽、蔡静桐和杨莉也参加了部分编写工作。参编者具体负责的编写内容见实验后署名。本书是上述老师和同学集体智慧的结晶，在此感谢他们为本书的编纂和出版付出的辛勤劳动！

本书可作为高等农林院校农学类专业和综合院校生物类专业本专科学生的实验教材，同时也可作为其他相关专业教师和学生的参考书。书中所用图片除了本人和参编作者的科研照片外，引用了部分图片。在此对图片贡献者致以诚挚的谢意。

对本书存在的不足之处，欢迎批评和指正。

周竹青

2013年5月

# 目 录



## 前言

细胞生物学实验规则 .....	1
-----------------	---

## 第一篇 实验仪器

实验 1 普通光学显微镜的工作原理及使用 .....	2
实验 2 倒置显微镜的工作原理及使用 .....	7
实验 3 相差显微镜的工作原理及使用 .....	9
实验 4 荧光显微镜的工作原理及使用 .....	12
实验 5 激光扫描共聚焦显微镜的工作原理及使用 .....	16
实验 6 流式细胞仪的工作原理及应用 .....	20
实验 7 冷冻高速离心机的工作原理及使用 .....	22
实验 8 透射电子显微镜的工作原理及使用 .....	24
实验 9 扫描电子显微镜的工作原理及使用 .....	26
实验 10 显微摄影技术 .....	28
主要参考文献 .....	30

## 第二篇 验证性实验

实验 11 动物细胞外部形态的扫描电子显微镜观察 .....	31
实验 12 细胞活体染色及细胞器显微观察 .....	33
实验 13 植物细胞超微结构观察 .....	40
实验 14 细胞有丝分裂观察 .....	43
实验 15 细胞膜的渗透性和细胞的凝聚反应 .....	46
实验 16 细胞电泳 .....	49

实验 17 小鼠巨噬细胞吞噬运动观察 .....	52
主要参考文献 .....	54

### 第三篇 综合大实验

实验 18 细胞器的分离 .....	55
实验 18-1 动物细胞器的分离 .....	55
实验 18-2 植物叶绿体的分离 .....	57
实验 19 显微细胞化学技术 .....	59
实验 19-1 细胞中 DNA 的显微定位 (Feulgen reaction) .....	59
实验 19-2 细胞中 RNA 的显微定位 .....	62
实验 19-3 过碘酸雪夫反应 (PAS) 定位细胞中多糖 .....	64
实验 19-4 苏丹黑 B 染色定位细胞中脂类 .....	66
实验 19-5 细胞中过氧化物酶的定位 .....	69
实验 19-6 细胞中酸性磷酸酶的定位 .....	70
实验 19-7 细胞中碱性磷酸酶的定位 .....	72
实验 19-8 植物细胞免疫荧光原位杂交 .....	73
实验 20 超微细胞化学技术 .....	77
实验 20-1 细胞中 ATP 酶的超微细胞化学定位 .....	78
实验 20-2 细胞中 $\text{Ca}^{2+}$ 的超微细胞化学定位 .....	80
实验 20-3 细胞中超氧阴离子的超微细胞化学定位 .....	82
实验 21 动物细胞培养 .....	85
实验 21-1 鸡胚成纤维细胞的原代培养和观察 .....	90
实验 21-2 细胞传代培养 .....	92
实验 21-3 培养细胞观察与活力测定 .....	95
实验 21-4 细胞分裂指数和生长曲线测定 .....	98
实验 21-5 细胞的冻存与复苏 .....	101
实验 21-6 动物细胞融合 .....	103
实验 22 植物细胞培养与应用 .....	107
实验 22-1 植物细胞培养技术 .....	107
实验 22-2 PEG 诱导植物原生质体细胞融合 .....	112
实验 22-3 外源 DNA 转化植物细胞技术 .....	115
实验 22-4 藻类植物细胞的培养及脂肪体诱导和观察 .....	119
主要参考文献 .....	122

## 第四篇 创新性实验

实验 23 细胞凋亡的诱导、检测与功能研究 .....	125
实验 23-1 动物细胞凋亡的诱导与检测 .....	125
实验 23-2 植物细胞编程性死亡的诱导与检测 .....	134
实验 24 细胞骨架观察与功能研究 .....	137
实验 24-1 免疫荧光抗体标记法观察动物细胞微管 .....	138
实验 24-2 鬼笔环肽标记法观察动物细胞微丝 .....	140
实验 24-3 动物细胞中等纤维的观察 .....	142
实验 24-4 考马斯亮蓝染色观察植物细胞微丝 .....	144
主要参考文献 .....	146
附录 常用试剂 .....	148

## 细胞生物学实验规则

细胞生物学实验作为一门独立的课程，它既与细胞生物学课堂讲授的理论部分有密切关系，又有其独特的课程体系和教学要求。学生通过细胞生物学实验可以验证细胞生物学相关理论，加深对理论知识的理解；同时能掌握细胞生物学的基本实验方法和技能，锻炼观察、比较和综合分析等科学思维能力，为将来从事相关研究和工作打下坚实基础。为了达到课程教学目的和要求，特制定如下实验规则和注意事项：

1. 每次上课前，学生必须认真预习实验指导书，了解本次实验内容、基本原理和操作步骤，明确实验目的要求和注意事项，做到心中有数。

2. 上实验课时学生必须携带实验指导书、实验报告纸和绘图文具。进入实验室要按实验教师的要求穿好工作服，对号入座。实验前，要认真检查所用仪器、药品是否齐备。没有教师允许，自己不得随意调换标本、药品和仪器等。

3. 实验时要听从教师安排，遵守课堂纪律，严禁彼此谈笑喧哗或随意走动。提问时要先举手后发言。

4. 按照实验指导书和老师的讲解独立完成实验操作。在实验中要仔细观察，做好记录，并及时完成实验报告。对基本技能要按操作程序反复练习，以达到一定的熟练程度。使用显微镜时要防止染料或试剂沾污镜头和镜台。检查永久片时，要特别小心，防止操作失误导致的损坏。使用有毒染料和试剂时要注意防护，防止操作不当引起的中毒。

5. 实验报告的撰写必须强调科学性，要求实事求是地记录和综合分析实验结果。实验结束后，可由教师组织学生讨论实验中出现的和提出改进意见。学生课后应认真阅读教师批改后的实验报告，注意老师提出的问题和和建议，并在今后的实验中加以改进。

6. 要爱护标本和器材设备。实验中如有器材损坏，应立即报告任课老师或实验人员，说明情况和填写报损表格，并按照实验室相关规定处理。实验中要注意节约实验材料和水电。

7. 实验结束后，学生要认真清理实验台面，将仪器放置到正确的位置；药品及其他用品要放回原处。废弃的实验材料要收集起来，集中处理；废弃的药液和染料等应倒在废物缸内集中收集，严禁随手倒入水槽中，污染环境。值日生要负责清扫实验室，收拾和处理垃圾，关好水电开关和门窗等。

## 实验仪器

### 实验 1 普通光学显微镜的工作原理及使用

#### 一、实验原理及背景知识

光学显微镜是 1590 年由荷兰的 Jansen 父子发明的。光学显微镜可把物体放大 1 500 倍，分辨率的最小极限为  $0.2\ \mu\text{m}$ 。其中普通光学显微镜主要用于观察生物组织的显微结构以及细胞形态和生长状态。光学显微镜主要由以下部分构成。

#### (一) 显微镜的光学系统

显微镜的光学系统主要包括物镜、目镜、聚光器、照明光源和滤光器等(图 1)。

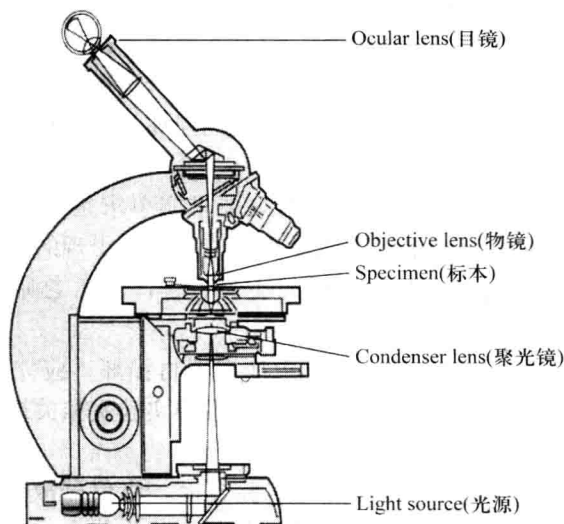


图 1 光学显微镜工作原理

1. 物镜 物镜决定了显微镜的性能。它为焦距较短的凸透镜，被安装在

物镜转换器上，接近被观察的物体，故称物镜或接物镜。

(1) 物镜种类。根据物镜和观测标本盖片间的介质情况，可分为干燥物镜和浸液物镜。后者又可分为水浸物镜和油浸物镜。最常用的浸没液为香柏油(表 1)。

表 1 常用介质及其折射率

介质	空气	水	香柏油	$\alpha$ 溴萘	玻璃
折射率	1	1.33	1.515	1.66	1.52

根据放大倍数不同，物镜可分为低倍物镜、中倍物镜和高倍物镜。低倍镜筒上刻有  $10\times$  或  $15\times$  标识，高倍镜筒上刻有  $40\times$  或  $45\times$  标识，油镜一般刻有  $100\times$  标识(图 2)。



图 2 光学显微镜不同放大倍数的物镜

(2) 物镜的主要参数。

① 放大倍数：指人眼看到像的大小与标本实际大小的比值。一般它指的是长度比值而非面积比值。物镜和目镜放大倍数的乘积就是显微镜的总放大倍数。

② 数值孔径 (N. A.)：也称镜口率，是判断物镜性能的重要标志。它与显微镜的分辨力成正比。N. A. 越大，显微镜分辨率越高，性能越好。常用物镜的数值孔径为  $0.05\sim 0.95$ ，而油浸物镜的数值孔径高达  $1.25$ 。

③ 工作距离：指能最清楚观察到标本时，物镜最前端到标本盖玻片间的距离。物镜的焦距越长，放大倍数越低，其工作距离就越长。 $10\times$  物镜有效工作距离为  $6.5\text{ mm}$ ， $40\times$  物镜有效工作距离为  $0.48\text{ mm}$ 。

④ 分辨率：也称分辨本领，指显微镜能分辨开两个物点间的最小距离。

数值越小，则分辨力越高，显微镜的性能越好。在明视距离（25 cm）之处，正常人眼能看清相距 0.073 mm 的两个物点，这个 0.073 mm 的数值，即为正常人眼的分辨距离。

在每个物镜上通常刻有反映其主要性能的参数，如 10×物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17，其中 10 为物镜的放大倍数，0.25 为数值孔径，160 为镜筒长度（mm），0.17 为盖玻片的标准厚度（mm）。

(3) 物镜功能。物镜将标本进行第一次放大，它决定显微镜分辨率的高低。

显微镜的分辨率由下列公式计算：

$$d=0.61\lambda/N. A.$$

式中， $d$  为物镜的分辨率（nm）； $\lambda$  是照明光线波长（nm）；N. A. 是物镜的数值孔径， $N. A. = n \times \sin \theta$ （ $n$  为介质折射率， $\sin \theta$  为透镜视锥半顶角的正弦）。可见物镜的分辨率由它的数值孔径和照明光线的波长决定。例如，油浸物镜的数值孔径为 1.25，可见光波长范围为 400~700 nm，取其平均波长 550 nm，则  $d=268.4$  nm。0.2  $\mu\text{m}$  是用可见光照明的显微镜分辨力的极限。

## 2. 目镜

(1) 目镜的结构。目镜一般由上下两组凸透镜组成，上面的凸透镜称接目透镜，下面的凸透镜称会聚透镜或场镜。上下透镜之间或会聚透镜下面装有一个光阑，它决定了视场的大小。目镜的长度越短，放大倍数越大。

(2) 目镜的作用。目镜的作用是将已被物镜放大的，分辨清晰的实像进一步放大，以使人眼能容易地分辨清楚。其放大倍数常为 5~16 倍。但是目镜只起放大作用，不会提高显微镜的分辨率。

**3. 聚光器** 聚光器也称集光器，主要由聚光镜和可变光阑组成，位于标本下方的聚光器支架上。

(1) 聚光镜的作用。聚光镜能会聚光线，增强标本的照明。聚光镜的聚光焦点一般设计在它上端透镜平面上方约 1.25 mm 处，使其正好在观察的标本上。因此在使用时要注意调节聚光镜的位置。有的聚光镜由几组透镜组成，最上面的一组可以卸掉或移出光路，降低聚光镜的数值孔径，来适应低倍物镜观察时的照明。聚光镜可分为明视场聚光镜和暗视场聚光镜。

(2) 可变光阑。可变光阑也称光圈，位于聚光镜下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔。通过调节中间圆孔的大小可以调节入射光强度，并使聚光镜的数值孔径和物镜的数值孔径相适应。可变光阑越大，数值孔径越大。利用低倍物镜观察时，光阑应调到适当的大小，以控制射入光线



的量,增加明暗差。转到高倍物镜下时,光圈要放大,使之能形成足够的光锥角度。

**4. 照明光源** 显微镜的照明光源可以分为天然光源和人工光源。

(1) 天然光源。为反射过来的太阳光,但不可利用太阳直射光。

(2) 人工光源。人工光源要求有足够的发光强度,但不能过多发热。现在一般显微镜均带有显微镜灯,可手动调节光源的发光强度。

**5. 滤光器** 滤光器安装在光源和聚光器之间,可以选择性地吸收掉一部分光线,让某一波段的光线通过,以此来改变光线的光谱成分或削弱光的强度。常见的有滤光片和液体滤光器。

**6. 盖玻片和载玻片** 盖玻片的标准厚度是  $(0.17 \pm 0.02)$  mm,不用盖玻片或用厚度不合适的盖玻片,都会影响成像质量。载玻片的标准厚度是  $(1.1 \pm 0.04)$  mm,太厚会影响聚光器效能,太薄则易破裂。盖玻片和载玻片的表面应平坦,无气泡且无划痕,以无色透明的最好,使用前应洗净。

## (二) 显微镜的机械装置

显微镜的机械装置具有固定与调节光学镜头、固定与移动标本等作用,包括镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器和调焦装置。

**1. 镜座和镜臂** 镜座为显微镜的支撑系统,其上装有照明光源和反光镜,而镜臂起到支撑镜筒和载物台的作用。

**2. 载物台** 又称工作台或镜台,其作用是安放载玻片。载物台中心有一个通光孔,通光孔后方左右两侧各有一个安装压片夹用的小孔。载物台的纵横坐标上常装有游标尺,一般读数为 0.1 mm。游标尺可用来测定标本的大小,也可用来对被检部分做标记。

**3. 镜筒** 镜筒上端放置目镜,下端连接物镜转换器。

**4. 物镜转换器** 物镜转换器固定在镜筒下端,有 3~4 个物镜接口,物镜常按放大倍数高低顺序进行排列。转换物镜时,应用手指捏住旋转碟旋转,不要用手指推动物镜,否则会导致光轴歪斜,使成像质量变差。

**5. 调焦装置** 显微镜上装有粗准焦螺旋和细准焦螺旋。粗准焦螺旋转动一周,镜筒上升或下降 10 mm;细准焦螺旋转动一周,镜筒升降 0.1 mm。

普通显微镜实物照片见彩版图。

## 二、实验目的

1. 了解显微镜的结构和工作原理。
2. 掌握显微镜的正确使用和保养方法。