

本教材由苏州大学研究生优秀教材建设基金和苏州大学医学部资助

细胞生物学与分子生物学 实验指导

主编 白艳艳 缪竞诚



苏州大学出版社
SOOCHOW UNIVERSITY PRESS

无机生物化学与分子生物学

实验指导

主编 王德成 副主编 王德成 王德成

科学出版社

本教材由苏州大学研究生优秀教材建设基金和苏州大学医学部资助

已作为苏州大学研究生和七年制医学生教学用书

细胞生物学与分子生物学 实验指导

主编 白艳艳 缪竞诚



苏州大学出版社
SOOCHOW UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学与分子生物学实验指导/白艳艳, 缪竞诚主编. —苏州: 苏州大学出版社, 2010. 9

本教材由苏州大学研究生优秀教材建设基金资助 由苏州大学医学部资助

ISBN 978-7-81137-587-9

I. ①细… II. ①白…②缪… 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(2010)第 183734 号

细胞生物学与分子生物学实验指导

白艳艳 缪竞诚 主编

责任编辑 廖桂芝

苏州大学出版社出版发行

(地址: 苏州市十梓街1号 邮编: 215006)

丹阳市兴华印刷厂印装

(地址: 丹阳市胡桥镇 邮编: 212313)

开本 787 mm×1 092 mm 1/16 印张 13.5 字数 335 千

2010年9月第1版 2010年9月第1次印刷

ISBN 978-7-81137-587-9 定价: 18.00 元

苏州大学版图书若有印装错误, 本社负责调换

苏州大学出版社营销部 电话: 0512-65225020

苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>

苏州大学研究生教学用书

编委会

- 主 编** 白艳艳 苏州大学
 缪竞诚 苏州大学
- 副主编** 白 霞 苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所、卫生部血栓与止血重点实验室
 庄文卓 苏州大学
- 编 委** 陈 慧 江西医学院上饶分院
 李炳宗 苏州大学
 魏文祥 苏州大学
 朱明清 苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所、卫生部血栓与止血重点实验室

序

《细胞生物学》是当前生命科学中的核心学科之一,也是重要的专业基础课,其理论与实验技术已广泛地用于医学与生物学领域的研究,在细胞的形态结构、基因表达与克隆、病毒、细菌、胚胎发育、人类疾病的发病机制及药物作用机制等方面的研究中发挥着重要作用.随着分子生物学研究的渗入,近年来分子细胞生物学也得到了突飞猛进的发展.目前许多医学院校已将《细胞生物学》与《分子生物学》作为本科生和研究生的必修课程或基础理论课程,并开设了专门的细胞生物学与分子生物学实验课程,学生们通过实验课的学习,能够进一步加深对理论课的理解,为今后临床和科学研究奠定基础.

编者精心选择了细胞生物学与分子生物学中的重要实验技术进行编写,此书主要分为5个部分共32个实验内容,涵盖了细胞生物学与分子生物学的常用技术与新技术,主要包括细胞的显微观察、细胞体外培养、细胞及其组分的分离纯化、细胞化学,以及生物大分子的分析 and 鉴定等技术,不仅可以作为细胞生物学与分子生物学课程的实验教材广泛使用,而且可以作为参考用书指导学生或科研人员开展科学研究工作.作为分子细胞生物学实验教材,此书可供医学专业的博/硕士研究生、七年制/五年制本科生使用,也可供生物相关专业学生使用.

中国工程院院士



2010年4月

目
录**第一篇 细胞的显微观察技术**

- | | | |
|-----|--------------------------|----|
| 实验一 | 光学显微镜的结构和使用方法 | 1 |
| 实验二 | 细胞的大小与形态 | 5 |
| 实验三 | 细胞计数与活力测定 | 8 |
| 实验四 | 细胞器的染色与形态学观察 | 11 |
| 实验五 | 线粒体的分离与观察 | 15 |
| 实验六 | DNA 的细胞化学反应——Feulgen 染色法 | 19 |
| 实验七 | 细胞有丝分裂各期的形态学观察 | 22 |

第二篇 细胞体外培养

- | | | |
|-----|--------------|----|
| 实验一 | 细胞培养的前期准备 | 26 |
| 实验二 | 原代细胞的分离与培养 | 31 |
| 实验三 | 细胞传代与观察 | 33 |
| 实验四 | 细胞的冻存与复苏 | 35 |
| 实验五 | 细胞生长曲线的测定 | 40 |
| 实验六 | 噻唑蓝(MTT)比色试验 | 43 |
| 实验七 | 细胞融合 | 46 |

第三篇 细胞及其组分的分离纯化

- | | | |
|-----|--------|----|
| 实验一 | 离心分离技术 | 48 |
| 实验二 | 流式细胞技术 | 55 |

实验三	免疫磁珠技术	57
实验四	细胞基因组 DNA 的分离技术	60
实验五	质粒 DNA 的抽提技术	63
实验六	细胞总 RNA 的抽提技术	66
实验七	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离 蛋白质技术	70
实验八	蛋白印迹技术	73
实验九	亲和层析技术	78

第四篇 细胞化学技术

实验一	酶细胞化学技术	81
实验二	免疫细胞化学技术	84
实验三	放射自显影技术	88
实验四	细胞的原位杂交技术	91

第五篇 生物大分子的分析 and 鉴定技术

实验一	聚合酶链反应(PCR)	95
实验二	Southern 印迹技术	98
实验三	Northern 印迹技术	100
实验四	RNA 干扰技术	104
实验五	基因芯片技术	107

附录 1	常用溶液的配制方法	111
------	-----------	-----

附录 2	细胞生物学与分子生物学词汇英汉对照及释义	129
------	----------------------	-----

参考文献		205
------	--	-----

第一篇

细胞的显微观察技术

实验一 光学显微镜的结构和使用方法

光学显微镜(light microscope)简称光镜(图 1-1-1),是研究细胞结构的重要工具.自 1665 年英国科学家罗伯特·虎克(Robert Hook)用自制的光学显微镜看到生命的基本结构——细胞以来,经过数百年的改进和更新,显微镜的结构与功能逐步完善,已成为生物医学研究的重要工具,在研究生物组织、细胞的结构中发挥了巨大作用.

【实验目的】

1. 掌握光镜的结构.
2. 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法.
3. 了解显微镜成像的原理.

【实验原理】

普通光镜由机械系统和光学系统两部分构成(图 1-1-2).光学系统主要包括物镜、目镜、聚光镜和光源等结构.分辨率(resolution)是评价显微镜放大效能的重要参数,它指能够分辨的两个质点的最小间距.普通光镜的最高分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$,是由所用光波波长长短和物镜数值口径决定的,缩短使用的光波波长或增加数值口径可以提高分辨率.可见光的光波幅度比较窄,紫外光的波长较短可以提高分辨率,但它不能用肉眼直接观察.因此,利用减小光波波长来提高光学显微镜分辨率是有限的,提高数值口径是提高分辨率的理想措施.要增加数值口径,可以通过提高介质折射率实现.以空气为介质时折射率为 1,而以香柏油为介质的折射率为 1.51,它与载片玻璃的折射率(1.52)相近,这样光线可以几乎不发生折射而直接通

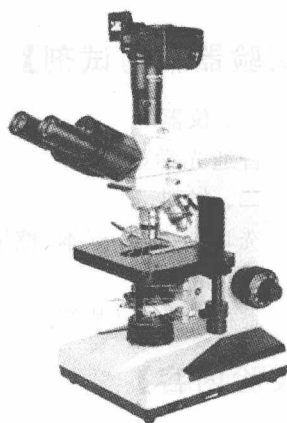


图 1-1-1 普通光学显微镜

过载片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率.显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积,而物镜的放大倍数越高,分辨率越高.

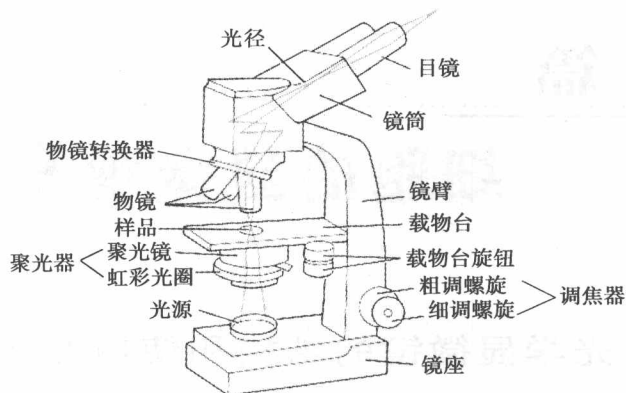


图 1-1-2 普通光学显微镜的结构示意图

【实验器材与试剂】

一、仪器

普通光学显微镜.

二、材料

洗耳球、玻片标本、擦镜纸.

三、试剂

香柏油、二甲苯等.

【实验内容】

一、光镜的结构

普通光镜的结构包括机械系统和光学系统.

(一) 机械系统

主要包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推片器、调焦器等.

1. 镜座(base): 是显微镜的底座,用以支持整个镜体.
2. 镜筒(tube): 镜筒上接目镜,下接转换器,形成目镜与物镜之间的暗室.
3. 物镜转换器(revolving nose-piece): 物镜转换器上可安装 3~4 个放大倍数不同的物镜,可根据需要选择其中任意一个物镜与镜筒接通.
4. 载物台(stage): 是位于物镜转换器下方的方形平台,用于放置玻片.载物台的中央有一圆孔,称为通光孔,下方光源的光线可穿过此孔照射到标本上.
5. 推片器(push-chip device): 由两个垂直的推进齿轴的金属架构成,附着在载物台上,起固定和移动标本位置的作用.有的推片器上还附有纵横游标尺,可确定标本的位置与计算标本移动的距离.游标尺主要分主标尺(A)和副标尺(B),副

标尺的尺度为主标尺的 $\frac{9}{10}$ 。通常在使用时先看副标尺的0点位置,再看主副标尺刻度线的重合点即可读出准确的数值。

6. 调焦器(focusing adjustment): 调焦器是调节焦距的装置,分粗调螺旋和细调螺旋两类,通常位于镜臂的两侧。粗调螺旋可使镜筒与载物台以较快速度或较大幅度升降,能快速调节并观察到物像,适于低倍镜观察时的调焦。细调螺旋则使镜筒与载物台以缓慢速度或较小幅度升降,用于标本不同层次观察,适于高倍镜或油镜的聚焦或焦距的精细调节。通常细调螺旋每转动一周,镜筒上下移动0.1mm。

(二) 光学系统

主要由光源、聚光器、物镜、目镜等结构组成,该系统可使物体放大形成物体放大像。

1. 光源(light source): 目前常用的显微镜镜座上装有光源,并可通过电流调节螺旋来调节光的强度。

2. 聚光器(condenser): 聚光器由聚光镜、虹彩光圈和升降螺旋组成,位于载物台下面,其作用是将光源发出的光线聚焦于样品上,以获得最强的照明,使物像明亮清晰。

3. 物镜(objective): 物镜是显微镜中最重要和最关键的光学元件,也称接物镜,安装在物镜转换器上。每个物镜由多片凸透镜和凹透镜组合而成,决定着光镜分辨率的高低。常用物镜的放大倍数有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ 。一般将 $4\times$ 或 $10\times$ 的物镜称为低倍镜;将 $40\times$ 的物镜称为高倍镜;将 $100\times$ 的物镜称为油镜。每个物镜都刻有反映其主要性能的参数,包括放大倍数和数值孔径,如 $10/0.25$ 、 $40/0.65$ 或 $100/1.25$,还有该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度,以及在油镜上标有“油”或“oil”等。标本的放大主要由物镜完成,物镜放大倍数越大,其焦距越短,焦距越短,物镜的透镜和玻片间距离(工作距离)也越小。油镜的放大倍数较高,通常为 $100\times$,故其工作距离很短,使用时需格外注意。

4. 目镜(ocular): 目镜的结构较为简单,普通光镜的目镜通常由两块透镜组成。其作用是将物镜放大的物像再放大一次,并可通过其观察物像。常用目镜的规格分为5倍、10倍、16倍及40倍。

二、普通显微镜的使用方法

(一) 低倍镜观察

先将低倍物镜的位置固定好,然后放置标本片,转动反光镜,调好光线,将物镜提高,向下调至看到标本,再用细调对准焦距进行观察。除少数显微镜外,聚光镜的位置都要放在最高点。如果视野中出现外界物体的图像,可以将聚光镜稍微下降,图像就可以消失。聚光镜下的虹彩光圈应调到适当的大小,以控制射入光线的量,增加明暗差。

(二) 高倍镜观察

显微镜的设计一般是共焦点的。低倍镜对准焦点后,转换到高倍镜基本上也是对准焦点的,只要稍微转动微调即可。有些简易的显微镜不是共焦点,或者是由于

物镜的更换而达不到共焦点,就要采取将高倍物镜下移,再向上调准焦点的方法。此时,虹彩光圈要放大,使之能形成足够的光锥角度。稍微上下移动聚光镜,观察图像是否清晰。

(三) 油镜观察

油镜的工作距离很小,所以要防止载玻片和物镜上的透镜损坏。使用时,一般是经低倍镜、高倍镜,然后到油镜。当高倍物镜对准标本后,再换油镜观察。载玻片标本也可以不经过低倍和高倍物镜,直接用油镜观察。显微镜有自动止降装置的,载玻片上加油以后,将油镜下移到油滴中,到停止下降为止,然后用微调向上调准焦点。没有自动止降装置的,对准焦点的方法是:从显微镜的侧面观察,将油镜下移到与载玻片稍微接触为止,然后用微调向上提升调准焦点。使用油浸镜时,镜台要保持水平,防止香柏油流动。油镜所用的油要洁净,聚光镜要提高到最高点,并放大聚光镜下的虹彩光圈,否则会降低数值口径而影响分辨率。无论是用油镜还是高倍镜观察,都宜用可调节的显微镜灯作光源。

【注意事项】

显微镜是精密贵重的仪器,必须很好地保养。显微镜用完后要放回原来的镜箱或镜柜中,同时要注意下列事项:

1. 实验结束后,移去观察的载玻片标本。
2. 用过油镜的须先用擦镜纸将镜头上的油擦去,再用擦镜纸蘸取二甲苯擦拭2~3次,最后再用擦镜纸将二甲苯擦去。
3. 转动物镜转换器,放在低倍镜的位置。
4. 将镜身下降到最低位置,调节好镜台上标本移动器的位置,罩上防尘套。

其中,镜头的保护最为重要。镜头要保持清洁,只能用软而没有短绒毛的擦镜纸擦拭;擦镜纸要放在纸盒中,以防沾染灰尘;切勿用手绢或纱布等擦镜头;物镜在必要时可以用溶剂清洗,但要注意防止溶解固定透镜的胶固剂。

根据不同的胶固剂,可选用不同的溶剂,如乙醇、丙酮和二甲苯等,其中最安全的是二甲苯。用胶固剂清洗物镜的方法是:用脱脂棉花团蘸取少量的二甲苯,轻擦,并立即用擦镜纸将二甲苯擦去,然后用洗耳球吹去可能残留的短绒毛。目镜是否清洁可以在显微镜下检视。转动目镜,如果视野中可以看到污点随之转动,则说明目镜已沾有污物,可用擦镜纸擦拭接目镜的透镜。如果还不能除去,再擦拭下面的透镜,擦过后用洗耳球将短绒毛吹去。在擦拭目镜或由于其他原因需要取下目镜时,都要用擦镜纸将镜筒的口盖好,以防灰尘进入镜筒内,落在镜筒下面的物镜上。

【复习思考题】

1. 使用光镜时,为什么必须从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序观察标本?
2. 简述光镜的结构和功能。

实验二 细胞的大小与形态

细胞(cell)是生物体结构与功能的基本单位.细胞的形态多样,大小不一,细胞内在的结构、自身的表面张力和外部的机械压力等相互作用,使各种细胞总能保持一定的形态,并适于完成其各自的功能.如:红细胞(red blood cell, RBC)为双凹圆盘状,适于在血管中流动;神经细胞(nerve cell)有长短不一的突起,具有感受刺激、传导冲动的功能;巨噬细胞(macrophage)呈不规则形,能伸出伪足,易于吞噬、杀灭外源的病原微生物.

细胞的体积差别也很大.大多数人或动物的细胞直径一般在 $20\sim 30\ \mu\text{m}$,必须借助于光镜观察.在观察细胞形态或结构之前,一般需进行染色处理.在普通光镜下,一般人或动物细胞的基本组成结构包括细胞膜(cell membrane)、细胞质(cytoplasm)和细胞核(nucleus)三个部分.

【实验目的】

1. 观察各种不同细胞的形态大小,从而对细胞的分类、进化及分化有所了解.
2. 判断和识别光学显微镜下各种细胞器的形态、大小和数目.
3. 掌握普通光学显微镜及测微尺的使用方法.

【实验原理】

生物种类繁多,形态大小各异.构成生物有机体最基本的结构和功能单位——细胞,随着生物物种、细胞存在的部位及其功能的不同在形态与大小上呈现一些区别.由于细胞体积比较小,我们心须借助于显微镜才可以观测出细胞形态、大小的差异.

光学显微镜的最高分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$,而细胞器的大小大部分在 $0.1\sim 10\ \mu\text{m}$,所以光学显微镜下可见到部分细胞器的外部形态,对于较大体积的细胞器、细胞核、质体等,还可见到其细微结构.

细胞器往往由特殊物质组成,因而可通过对特异物质的区别染色把各种结构区分开来.每种细胞器都有特殊的形态、大小、分布及数目,这也是我们判断、识别细胞器的依据.而每种细胞器在不同细胞、不同发育时期和不同生理状态下的形态、大小会有所不同.

【实验器材与试剂】

一、仪器

光学显微镜、测微尺等.

二、材料

玻片标本、人口腔上皮细胞、牙签等。

三、试剂

1%伊红染液。

【实验内容】

一、细胞形态与大小的观测

1. 用目镜测微尺分别在高倍镜和油镜下测量镜台测微尺,从而算出所用显微镜中目镜测微尺每格所代表的实际长度。

2. 用高倍镜及油镜观察各种玻片标本,并且用目镜测微尺测量细胞和细胞核的长、短径的长度。

3. 选取细胞膜和核膜界限清晰的玻片标本或涂片标本测量.测量时可旋转目镜(测微尺)及移动载玻片,将被测细胞置于测微尺轴线上。

4. 根据测量结果计算各种细胞及细胞核的体积。

① 椭球形:

$$V=4\pi ab^2/3$$

注: a —长半径; b —短半径

② 圆球形:

$$V=\pi r^2$$

注: r —半径

③ 圆柱形:

$$V=\pi r^2 h$$

注: r —半径; h —高度

④ 核质比(N/D):

$$N/D=V_n/(V_c-V_n)$$

注: V_n —核的体积, V_c —细胞质的体积。

二、细胞显微结构观察

主要进行口腔颊部黏膜上皮细胞的临时装片标本的制备与观察。

(一) 标本制备

准备一张洁净的载玻片,吸取浓度为1%的伊红溶液,滴1滴在载玻片中央,用灭菌的牙签伸入自己口腔颊部轻轻刮取黏膜上皮细胞,然后将粘有黏膜上皮细胞的牙签置于染液中并来回搅动,染色1 min后加盖玻片,注意防止产生气泡,并用滤纸吸去盖玻片周围多余的液体。

(二) 显微镜观察

将自制的上述标本置于光镜载物台上,先用低倍镜寻找分散、轮廓清晰的上皮细胞.镜下可见细胞呈淡红色,成群或分散分布,细胞形态呈扁平椭圆状,然后换成

高倍镜继续观察,可见口腔黏膜上皮细胞有一层薄薄的细胞膜,细胞核位于细胞中央,呈深红色,细胞质呈浅红色(图 1-2-1)。

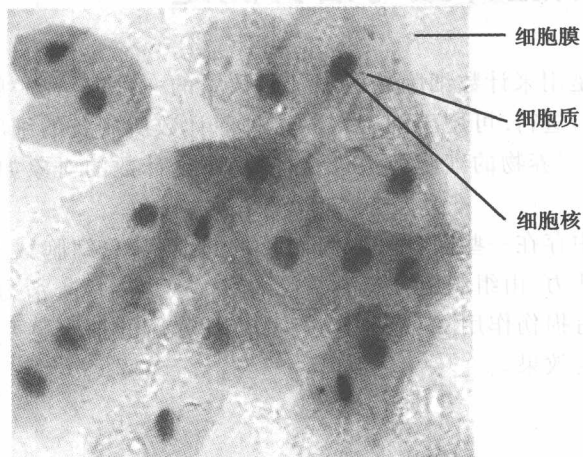
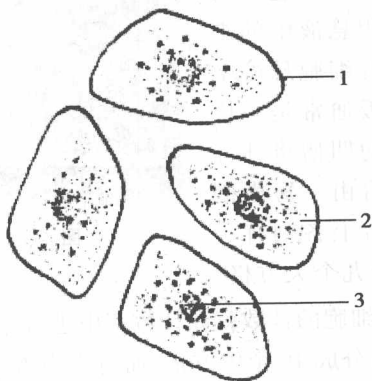


图 1-2-1 人口腔黏膜上皮细胞(光镜,200×)

三、生物绘图

生物绘图是采用绘图的方法形象地记录生物体外部形态与内部结构的一种科学记录方法.注意在绘图前对被描绘的对象细致观察,选择有代表性、清楚的位置进行描绘.所绘形态、大小及比例要掌握好,线条粗细均匀,各个结构需在一侧引出直线注明,引线之间不能交叉(图 1-2-2).



(1. 细胞膜 2. 细胞质 3. 细胞核)

图 1-2-2 生物绘图法绘制人口腔黏膜上皮细胞

【复习思考题】

绘制口腔黏膜上皮细胞(放大 200 倍视野下),并测出细胞大小。

实验三 细胞计数与活力测定

细胞计数法是用来计数细胞悬液中细胞数量的一种方法。一般使用血细胞计数板(简称计数板)进行。可用于细胞培养接种前计数所制备的细胞悬液中的细胞数量,也可用于对培养物的细胞数量进行计数。不论计数的对象如何,均须制备分散的细胞悬液。

在细胞群体中存在一些因各种原因而死亡的细胞,总细胞数中活细胞所占的百分比叫做细胞活力。由组织中分离的原代细胞一般也要检查活力,以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用。细胞培养过程中,复苏后的细胞也要检查活力,以此了解冻存和复苏的效果。

【实验目的】

1. 掌握最基本的细胞计数方法。
2. 掌握基本的细胞活力测定方法。

【实验原理】

利用显微镜的成像原理,使用血细胞计数板(图 1-3-1),计算单位体积的细胞的数量。当待测细胞悬液中细胞均匀分布时,通过测定一定体积悬液中的细胞数目,即可换算出每毫升细胞悬液中的细胞数目。血细胞计数板通常是一块特制的载玻片,四条平行的凹槽将其分隔成三个平台。中间的平台由一短横槽分隔成两半,每一边的平台上各刻有一个方格网,每个方格网共分九个大方格,

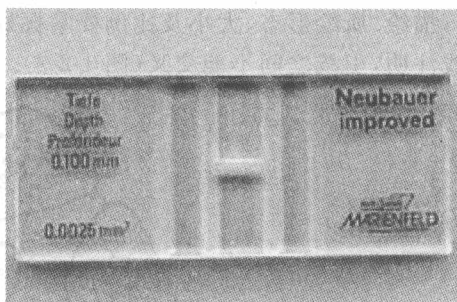


图 1-3-1 血细胞计数板

中间的大方格即为计数室,细胞的计数就在计数室中进行。计数室的刻度一般有两种规格:一种是一个大方格被分成 16 个中方格,而每个中方格又被分成 25 个小方格,共 400 小格;另一种是一个大方格被分成 25 个中方格,而每个中方格又被分成 16 个小方格,总共也是 400 小格。因此,无论是哪种规格的计数板,每一个大方格中的小方格数量都是相同的。每一个大方格边长为 1 mm,则每一大方格的面积为 1 mm^2 ,盖上盖玻片后,载玻片与盖玻片之间的高度约为 0.1 mm,所以计数室的容积为 0.1 mm^3 。

在测定细胞活力过程中,用台盼蓝染液对细胞进行染色,死细胞着深蓝色,而活细胞不着色,以此可以区分死细胞与活细胞。

【实验器材与试剂】

一、仪器

白细胞计数板、显微镜。

二、材料

吸管及橡胶头、鸡红细胞悬液等。

三、试剂

0.17 mol/L NaCl 溶液、0.4% 台盼蓝溶液等。

【实验内容】

一、鸡红细胞计数

1. 制备鸡红细胞悬液(1份鸡血+10份0.17 mol/L NaCl 溶液)。
2. 用70%乙醇将计数板及专用盖玻片擦拭干净,然后用绸布轻轻拭干。
3. 用吸管轻轻吹打细胞悬液,混匀,取少许细胞悬液,在计数板上盖玻片的一侧加微量细胞悬液,使悬液充盈盖玻片和计数板之间,静置3 min。注意操作过程中防止盖玻片下产生气泡,防止细胞悬液流入边槽中。

4. 用10×物镜观察计数板四角大方格(图1-3-2)中的细胞数量,注意压线细胞只计左侧和上方的。(注意:镜下偶见有两个以上细胞组成的细胞团,应按单个细胞计算,若细胞团占所计细胞数量10%以上,说明分散效果不好,需要重新制备细胞悬液。)

5. 细胞数/毫升原液 = (四个大方格细胞数之和/4) × 10⁴ × 稀释倍数

说明:

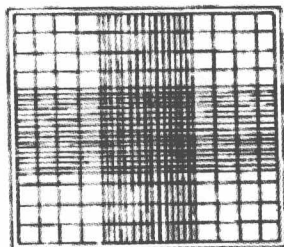
- ① 公式中除以4,因为计数了4个大格的细胞数。
- ② 公式中乘以10⁴因为计数板中每一个大格的体积为:
1.0 mm(长) × 1.0 mm(宽) × 0.1 mm(高) = 0.1 mm³
1 mL = 1 000 mm³



(a) 正面图



(b) 纵切面图



(c) 放大后的方格网计数室

图 1-3-2 放大的细胞计数室