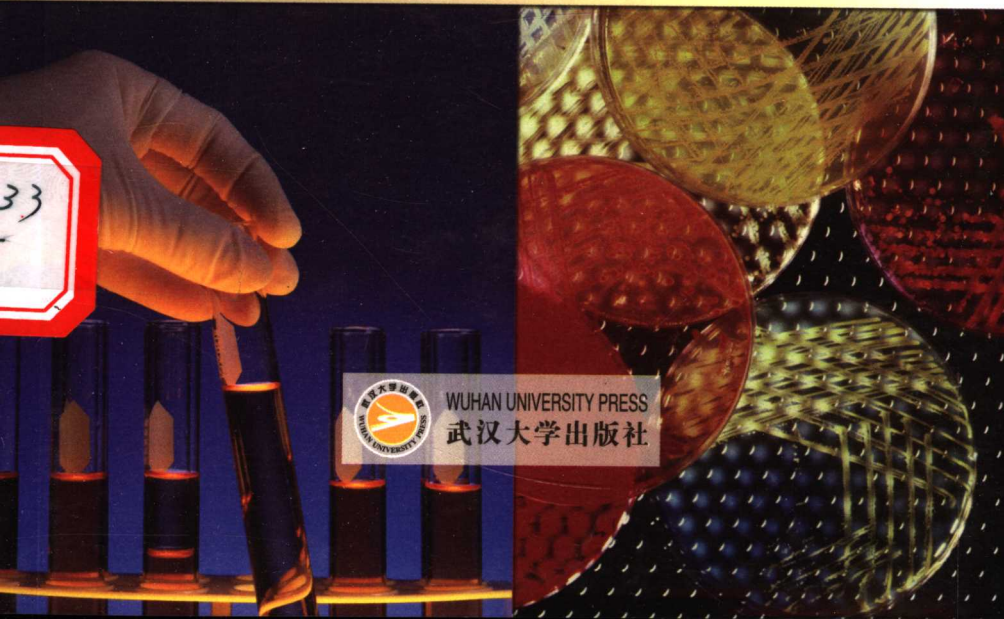


# 细胞生物学实验教程

刘江东 赵刚 邓凤姣 马文涛 邱金凤 编著

余其兴 主审



WUHAN UNIVERSITY PRESS  
武汉大学出版社

# 细胞生物学实验教程

刘江东 赵刚 邓凤姣 马文涛 邱金凤 编著

余其兴 主审



WUHAN UNIVERSITY PRESS  
武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程/刘江东等编著;余其兴主审. —武汉:武汉大学出版社,2005.6

ISBN 7-307-04493-5

I. 细… II. ①刘[等]… ②余… III. 细胞生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 033765 号

责任编辑:黄汉平 责任校对:王 建 版式设计:支 笛

---

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:wdp4@whu.edu.cn 网址:www.wdp.com.cn)

印刷:湖北省通山县九宫印务有限公司

开本:850×1168 1/32 印张:4.75 字数:119千字

版次:2005年6月第1版 2005年6月第1次印刷

ISBN 7-307-04493-5/Q·83 定价:9.00元

---

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

# 前 言

细胞是生物的基本结构单位,细胞生物学是研究细胞基本生命活动规律的科学。随着生命科学研究的深入和发展,细胞研究已经成为多学科研究交叉的领域,如遗传学、分子生物学、生物化学、发育生物学、蛋白质组学和神经生物学等,新的成果和理论不断涌现,业已成为探索生命奥秘的前沿和焦点。

在我国生命科学高等教育教学中,细胞生物学被指定为主干课程之一,细胞生物学实验也是该课程的重要组成部分。通过实验,学生不仅验证了理论知识,获得了感性认识,同时也学习了基本实验技能,为今后的学习和科研奠定了基础。目前国内各高校生命科学专业基本都开设了细胞生物学实验,但迄今为止正式出版、内容较新的相关实验教材尚屈指可数。因此,我们在总结多年的教学经验的基础上,借鉴兄弟院校的教学成果并结合学科发展,编写了本书,旨在为教学提供一部适用性强、内容较为全面和新颖的实验教程。

全书共计 17 个实验,既包括经典的细胞学、细胞器形态学、细胞遗传学、细胞化学、细胞生理、细胞培养、电镜标本制备等方面的内容,同时也涵盖了细胞凋亡分析、荧光原位杂交、绿色荧光蛋白表达、流式细胞分选等较新的技术和方法,力求在各高校常有的实验条件下,尽可能全面地培养学生细胞生物学实验技能。

参加本书编写的人员有武汉大学生命科学学院刘江东、邓凤姣、马文涛、邱金凤、湖北中医学院基础医学部生物学教研室赵刚,全书完成后由余其兴教授进行了全面审定。全书的统稿、整理和

插图的技术性处理由刘江东完成。

本书可供综合性大学、师范院校、农林院校和医学院校生命科学专业的教师和学生使用,也可供相关专业人员参考。

由于编者水平所限和时间仓促,本书可能存有错误和不足之处,诚请使用者给予批评指正。

刘江东  
2005年2月

# 目 录

前 言	1
实验一 光学显微镜的结构、原理和使用方法	1
实验二 细胞形态结构的观察、细胞计数和显微测量	15
实验三 细胞吞噬活动的观察和活体染色	23
实验四 细胞内过氧化物酶的显示——联苯胺反应	26
实验五 细胞器和减数分裂的观察	28
实验六 动物染色体标本的制备和观察	35
实验七 细胞骨架的观察	39
实验八 动物细胞线粒体的分离	47
实验九 细胞培养的准备——实验用品的清洗与消毒	52
实验十 原代培养	60
实验十一 细胞系的维持培养、冻存和复苏	72
实验十二 细胞融合	82
实验十三 放线菌素 D 诱导细胞凋亡形态学观察	87
实验十四 绿色荧光蛋白(GFP)在人源细胞中的表达	90
实验十五 电子显微镜工作原理和样品制备	93
实验十六 荧光原位杂交	110
实验十七 流式细胞分离	118
附录一 光学仪器的保养与清洁	123
附录二 国内外细胞库介绍	125
附录三 化学试剂的分级和保存方法	128

附录四	试剂浓度的表示法及其计算.....	130
附录五	常用元素的原子量表.....	133
附录六	实验室中常用酸碱浓度和比重的关系.....	135
附录七	载玻片和盖玻片的使用.....	139
附录八	磷酸盐缓冲液的配制.....	141

# 实验一 光学显微镜的结构、 原理和使用方法

1604年，荷兰人 Janssen 制造了世界上第一台光学显微镜，17世纪中叶，英国人胡克和荷兰人列文虎克制造了分辨率更高的显微镜，从此人类打开了微观世界的大门，建立了细胞学理论。光学显微镜作为观察研究细胞结构的基本设备，一直沿用至今。随着科学技术的发展，人类的光学显微技术获得了长足的进步，极大提高了分辨率，并且通过改进某些光学部件，制造了适用于不同用途的多种特殊显微镜，如相差显微镜、暗视野显微镜、偏振光显微镜、荧光显微镜等，为生命科学研究提供了有力的观察工具。因此学习各种常用显微镜的工作原理，充分发挥其特长，获得清晰的图像和良好的观察效果，对于细胞生物学研究具有重要的意义。

## 【实验目的】

了解几种光学显微镜的构造、原理、用途和使用方法。

## 【材料和试剂】

明视野显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、偏振光显微镜、荧光显微镜。

人血细胞涂片、轮藻、草履虫、马铃薯淀粉颗粒、水绵、培养中的 HeLa 细胞。



## 【实验原理】

### 一、明视野光学显微镜 (bright field microscope)

#### 1. 原理

明视野显微镜是最常用的一种光学显微镜，其光学系统包括光源、聚光镜、目镜和物镜等，如图 1-1 所示。其中目镜和物镜各由一组结构复杂的透镜组成，其功能相当于一块凸透镜，由于组合透镜彼此精密配合，因此能够较好地消除各种像差。如图 1-2 所示，在光源的照射下，标本 AB 透过物镜形成一个实像  $A'B'$ ，再通过目镜进一步放大，当人眼在目镜后观察时，可以看到一个接近标本平面的放大的虚像  $A''B''$ 。

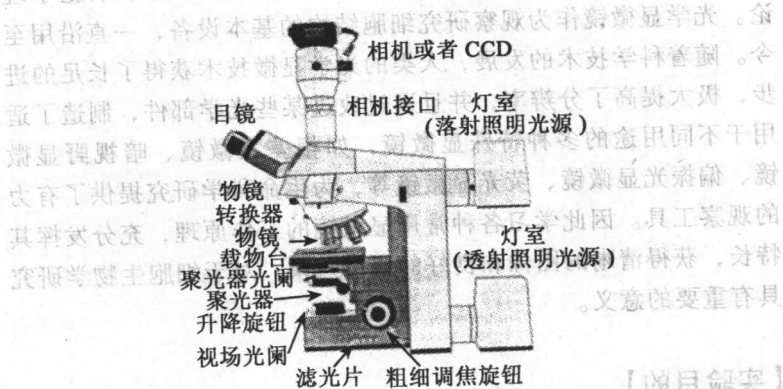


图 1-1 显微镜结构 (David L. Spector, 1998)

**目镜：**位于镜筒上端，最靠近观察者的眼睛。一台显微镜通常配置 2~3 个目镜，常见的有放大 5、10 和 15 倍的目镜（用  $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$  标志），可以根据需要选择使用。

**物镜：**又称接物镜，是显微镜中最重要的部件，其质量直接与观察效果和图像质量相关。一台显微镜通常有 3~4 个不同放

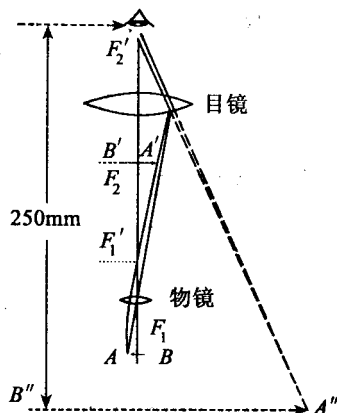


图 1-2 明视野显微镜原理图 (仿 李素文, 2001)

$F_1$  物镜的前焦点;  $F_1'$  物镜的后焦点;

$F_2$  目镜的前焦点;  $F_2'$  目镜的后焦点。

大倍数的物镜, 如  $4\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$  和  $100\times$  等,  $100\times$  物镜需要将末端浸在香柏油中使用, 称为油镜。从外观上看, 放大倍数越高的物镜, 其长度越长。每个物镜上都标有性能参数, 如图 1-3 所示, “ $40/0.65\ 160/0.17$ ” 说明该物镜的放大倍数为 40 倍, 数值孔径为 0.65 (表示镜头的通光能力, 在相同的放大倍数下, 该数值越大越好), 要求的镜筒长度为 160mm, 盖玻片厚度为 0.17mm, 油镜上还标有“油”或者“oil”字样。不同的物镜处于工作状态时 (物像清晰), 物镜最下端与盖玻片之间的距离称为工作距离。物镜的放大倍数与工作距离成反比, 当使用高倍镜时物镜与标本之间的距离最小, 因此尤其要注意防止镜头触碰载玻片, 以免损坏镜头。

## 2. 观察人血细胞涂片标本

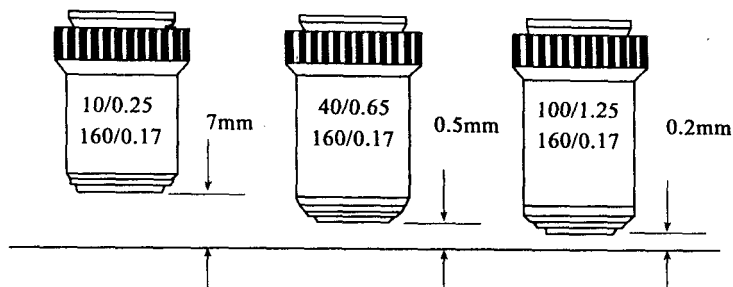


图 1-3 物镜及其工作距离 (辛华, 2001)

## 二、相差显微镜 (phase contrast microscope, Ph)

### 1. 原理

1935 年荷兰物理学家 Frits Zernicke 发明了相差显微镜, 其优点是能够观察活细胞和未染色的样品。它利用光的衍射和干涉原理, 将人眼无法感受到的光的相位变化转换成为人眼可以感受到的振幅变化, 从而将无色透明物体中的细节表现为明与暗的对比。

如图 1-4 所示, 同普通光学显微镜相比, 相差显微镜在聚光器前焦平面增加了一块环形光阑 a, 同时在物镜中放置一片与之匹配的相位板 b。环形光阑使照明光线形成一中空的光锥投射到标本上, 并由此产生两种光线: 一种光线没有发生衍射, 继续直行, 称为 0-级非衍射光波, 占光线的主体, 另外一种发生了衍射, 方向改为斜行, 称为衍射级光波, 只占光线的一小部分。位于物镜中的相位板具有两个功能: 一是减弱或者吸收 70% ~ 80% 的 0-级非衍射光; 二是使得 0-级光的相位移动  $1/4$  波长 ( $\lambda/4$ )。该装置改变了衍射波阵面和非衍射波阵面之间的振幅和相位关系, 使两种光线能够更好地发生干涉现象。

当同一种光通过细胞时, 由于细胞不同部分的折射率不同, 因此通过细胞的光线比未通过细胞的光线相位落后, 而通过细胞

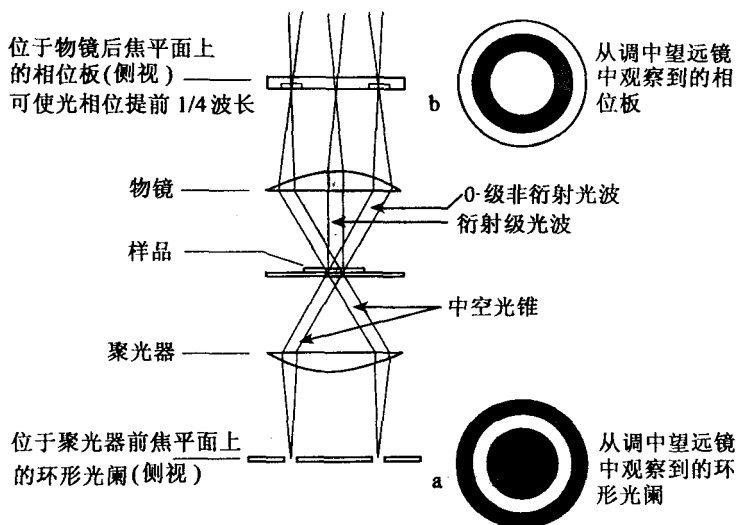


图 1-4 相差显微镜光路图 (David L. Spector, 1998)

核的光线比通过细胞其他部分的相位更加落后 (如图 1-5 所示)。这种因为结构差异而产生的光线的相位差异, 在通过相差显微镜的相位板后会发生相互干涉, 如果衍射光线和 0-级光线相位相反, 则合光的振幅减小, 物体图像变暗, 如果相位相同, 则合光的振幅增大, 图像变亮, 因此, 无色透明的样品的细微结构在显微镜下表现出明暗的对比从而可被识别, 如图 1-6 所示。

相差显微镜的相位板是安装在物镜内部的 (如 Olympus BH-2 型), 通常用字母 “P” 或者 “PL” 来表示该镜头为相差物镜。同一台显微镜上, 不同放大倍数的物镜须同与之对应的环形光阑配合使用, 通常数个环形光阑组合安装在聚光器上方的一个圆形转盘上, 如使用 20× 的相差物镜, 则将转盘旋转到刻度 “20” 处即可。当转盘旋转到 “0” 处时, 表示光路中无环形光阑, 此时显微镜可作为明视野光学显微镜使用。

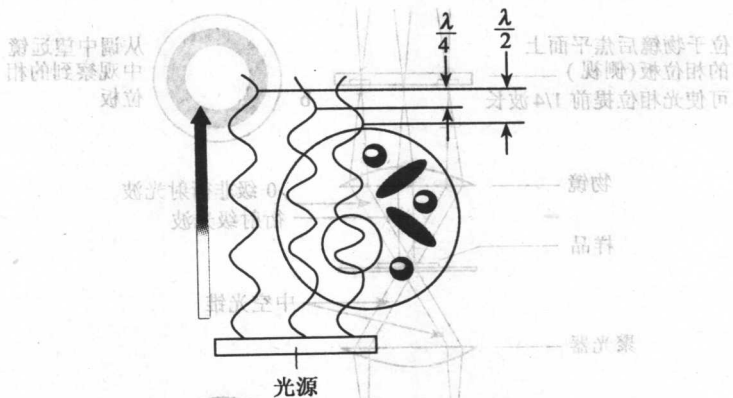


图 1-5 光线通过细胞的不同结构后产生不同程度的滞后 (引自 Karp, 1999)

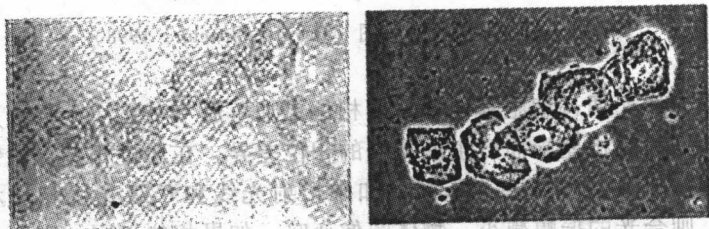


图 1-6 未染色细胞样品在明视野显微镜和相差显微镜下成像的比较

为了获得较好的相差观察效果，被检材料厚度要求不超过 20 微米 (最好小于 5 微米)，载玻片厚薄均匀，厚度 1 毫米左右，盖玻片厚度 0.17 毫米左右。

## 2. 实验观察材料

轮藻的胞质环流或者纤毛虫等原生动物。

### 三、暗视野显微镜 (dark field microscope)

#### 1. 原理

暗视野显微镜是利用丁达尔 (Tyndall) 光学效应的原理, 在普通光学显微镜的结构基础上改造而成。它是在聚光器中嵌入一块中央遮光板, 使光源发出的大部分光线被遮挡, 不能直接通过聚光器进入物镜, 因此在目镜中只能看到黑色的视野, 观察不到任何图像。如果样品在斜射光线的照射下, 表面发生了反射, 在目镜中可以观察到黑色背景中物体表面清晰的图像, 如图 1-7 所示。

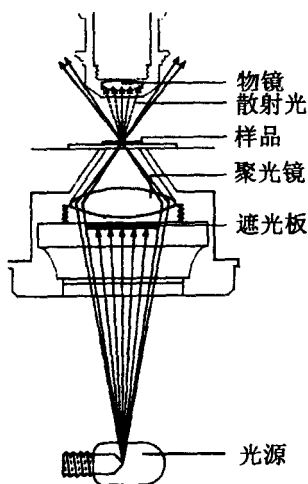


图 1-7 暗视野显微镜的光路图 (仿 王金发, 2003)

由于图像和背景之间的强烈反差, 暗视野显微镜能够提供远远超过光学显微镜分辨极限的高分辨率。但是暗视野显微镜观察到的只是物体表面反射的光线, 因此, 只能观察物体的表面特征, 如细胞的轮廓、鞭毛、纤维等, 而不能分辨内部的细微构造。

## 2. 实验观察材料

草履虫。

### 四、偏振光显微镜 (polarized light microscope, Pol)

#### 1. 原理

生物体内的肌肉、神经、骨组织、纤维或者任何纤维状结构(如纺锤丝)等成分,往往具有一定的分子对称结构或者优先的分子取向,导致它们在相互垂直的方向上有不同的折射率。如图 1-8A 所示,当一束偏振光通过这类双折射性物质后,会被分解成为振动方向相互垂直的两个偏振光分量。

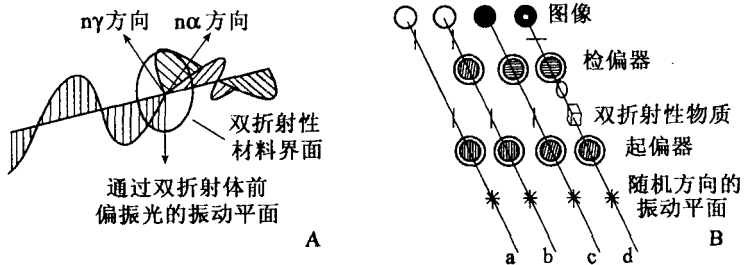


图 1-8 偏振光显微镜(仿 David L. Spector, 1998)

- A. 线形偏振光通过双折射性物质后,被分解为振动方向相互垂直的两个偏振光波分量;B. a. 只有起偏器; b. 起偏器与检偏器光轴方向平行; c. 起偏器和检偏器光轴方向垂直; d. 双折射性样品位于光路中。

偏振光显微镜是在普通光学显微镜的结构基础上,添加了两片尼科尔棱镜,从而可以对上述材料的折射特性进行观察。位于聚光器下的棱镜称为起偏器,位于目镜和物镜之间的称为检偏器,如图 1-8B 所示。当两者产生的偏振光的振动方向正交时,起偏器产生的偏振光被检偏器完全阻挡,此时视野是全黑的,如图 1-8Bc。当放置的标本中含有双折射成分时,折射光可通过检

偏器，因而在目镜中可看到发亮的被检物，如图 1-8Bd 所示。

偏振光显微镜通常用来检测生物体内某些有序结构、晶体的存在及其折射光学性质，同时也可用来检测某些组织中的化学成分。

## 2. 实验观察材料

马铃薯淀粉颗粒。

## 五、荧光显微镜 (fluorescence microscope)

### 1. 原理

荧光显微镜是利用紫外线作为光源，照射被观察物体产生荧光，从而观察样品的形态、确定产生荧光的物质的成分、分布等。

物质被紫外线照射后，产生荧光的现象可以分为两种：一种为自发荧光，如血红素和叶绿素在紫外线照射下发出的红色荧光；另外一种为诱发荧光，即物体经过荧光染料或试剂处理后在紫外线下发出荧光。这两种荧光在荧光显微镜下均能被观察并被利用。

以 Olympus BX51 荧光显微镜为例，荧光显微镜通常包括灯室、荧光立体滤光器、物镜、目镜等结构（如图 1-9 所示）。

灯室：内有高压汞灯或者氙灯，在工作状态下发射出紫外线。电源开启后，需要经过几分钟预热时间，待灯泡达到稳定工作状态时，才能进行观察。灯泡关闭后应该等待 15 分钟左右才能重新开启。灯泡是有使用寿命的，一般在 100 ~ 1 000 小时范围内，取决于灯泡本身的设计、使用情况、操作维护等。灯泡达到使用寿命后，性能会下降，即使仍然能够发光，但是产生的光线可能已经偏离原有的波段，应予更换。

荧光立体滤光器：按照紫外线光路可将荧光显微镜分为直射式和落射式两类。现在大多数显微镜采用落射式，其使用方便，只更换滤光器就能获得所需波长的激发光，如图 1-10 所示。滤光器由激发滤光片 (excitation filter)、光束分色镜 (beamsplit-



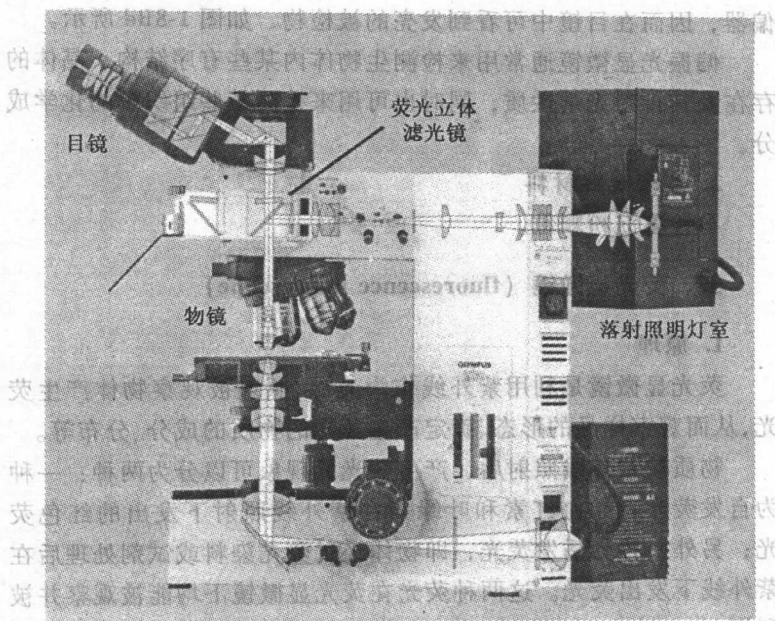


图 1-9 Olympus BX51 荧光显微镜光路图

ter) 和发射滤光片 (emission filter) 等组成。激发滤光片是单色滤光片, 只能让所需波长的紫外线透过。光束分色镜是一块在光路中斜向下 45° 放置的带有特殊涂层的玻璃片, 该涂层可以反射绝大部分的短波光线 (紫外线), 而对样品产生的长波光线 (荧光) 则几乎完全透过。发射滤光片是有色滤光片, 能够减弱所有的激发光线, 并让荧光有效透过。

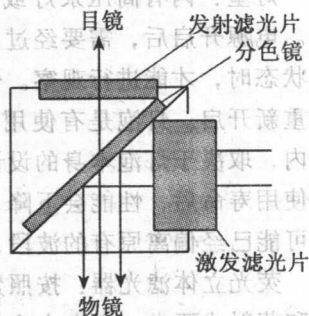


图 1-10 荧光立体滤光器结构示意图