

细胞生物学实验指南

EXPERIMENTS IN CELL BIOLOGY: A STUDENT'S GUIDE



主编 丁明孝 苏都莫日根 王喜忠 邹方东



高等教育出版社
Higher Education Press

细胞生物学实验指南

Experimental Manual of Cell Biology

第 2 版

细胞生物学实验指南

EXPERIMENTS IN CELL BIOLOGY: A STUDENT'S GUIDE

主编 丁明孝 苏都莫日根 王喜忠 邹方东

编者 北京大学	苏都莫日根 丁明孝
四川大学	邹方东 李虹 杨军 王喜忠
清华大学	王宏英 张贵友
北京师范大学	张伟 桑建利
复旦大学	郭滨
上海交通大学	曹阳 秦敏君
浙江大学	严庆丰
武汉大学	刘江东
东北师范大学	曾宪录
华南农业大学	孙京臣



高等教育出版社
Higher Education Press

00-53165 号牌

内容简介

本实验教材分3个部分,共编写了30个实验,分属16个主题。第一部分“显微镜的使用”,强调掌握显微镜的调试和使用的基本技能,了解各种不同的光学显微镜及电子显微镜的基本原理、特点和应用范围。第二部分“基本实验技术”,侧重于细胞组分的原位定性分析、细胞培养与细胞融合、细胞组分分离分析和细胞分选与分析技术等实验内容。第三部分“细胞的结构、功能与生命活动”,在一定程度上验证细胞生物学授课的某些内容,但更多的是侧重培养学生分析与解决问题的能力,建立科学的研究方法和正确的科学态度。

本书由来自全国10所高等院校的17位富有实验教学经验的教师共同编写完成。编写中以培养学生创新性思维与实践动手能力为主要宗旨,在实验课教学内容上做了较多改进,强调实验的可操作性,各高校可根据自身教学资源条件和实验教学时间进行自主选择。

本书附学习卡一张,通过学习卡可访问“《细胞生物学实验指南》资源网站”。网站内容包括实验教材中每一个实验的实验准备要点、实验设计思路及课堂授课要点、实验结果与讨论、思考题参考答案要点、参考文献等,还有部分实验教学的PPT课件。

本书适合作为高等院校生命科学类专业细胞生物学基础实验课程的教材使用,也可供相关科研及实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验指南/丁明孝等主编.—北京:高等教育出版社,2009.6

ISBN 978-7-04-026152-3

I.细… II.丁… III.细胞生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV.Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第045743号

策划编辑 王莉 责任编辑 张晓晶 封面设计 张楠 责任绘图 尹莉
版式设计 范晓红 责任校对 王超 责任印制 宋克学

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
总机 010-58581000

经销 蓝色畅想图书发行有限公司
印刷 北京凌奇印刷有限责任公司

开本 787×1092 1/16
印张 10.75
字数 250 000
彩插 2

购书热线 010-58581118
免费咨询 400-810-0598
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版次 2009年6月第1版
印次 2009年6月第1次印刷
定价 19.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究
物料号 26152-00

前言

近些年来细胞生物学快速发展,相形之下细胞生物学实验课教学却显得内容陈旧、明显滞后,在大力强调培养学生注重“知识、能力和素质”全面协调发展的情况下,实验课教学如何与时俱进,很多老师都在进行积极探索并为此做出了很大的努力。本书正是经过多年酝酿、调研,经10所高校十几位教师的共同努力,历时近两年完成的。

一、指导思想

培养学生创新性思维与实践动手能力,是我们实验课教学的主要宗旨之一。实验课教学不仅有助于帮助学生了解和掌握实验技能,培养学生科学的工作态度,也有利于加强学生科学道德修养、培养学生的合作精神。我们期望通过实验课教学互动,帮助学生树立相关的科学研究的基本理念:如何批判性地读书与阅读文献;如何设计实验,特别是对照实验;如何进行实验的风险评估并采取相应的对策;如何在实验过程中发现问题、解决问题;如何做好实验记录、分析结果;如何写实验报告(科研论文)等。这方面内容建议大家读一读纽约大学孙同天教授的一篇文章(Nature Review/ Molecular Cell Biology, 5:577-581, 2004)。

目前细胞生物学实验课的难点是,能否在有限的学时、有限的经费、有限的仪器设备条件下,实现上述验证课的教学宗旨。为此,我们在实验课教学内容上,做了较多改进,在每个“小实验”的前面都编写了一段“背景与原理”,推荐了相关的阅读文献。目的是为了扩展学生的科学视野,激发学生能够“举一反三”。同时,更需要我们老师从培养学生掌握科学研究方法和树立科学态度的角度去思考、去探索,把实验课开得更好。

二、主要内容

考虑到细胞生物学学科的特点和与其他学科的关系,本书教学内容主要包括3个部分:

第一部分是显微镜的使用。显微镜的使用是细胞生物学研究的基本实验手段。通过实验课掌握显微镜的调试和使用的基本技能,了解各种不同的光学显微镜及电子显微镜的基本原理、特点和应用范围,是十分必要的。应该说这部分内容是最具学科特点,又广泛用于其他学科领域的实验内容,因此是本书的重点内容。

第二部分是基本实验技术。广义的细胞生物学技术,是指用来解决细胞生物学问题的技术。可以说当今的生命科学中几乎没有什么科学问题与细胞和细胞生物学无关。因此,我们考虑到本学科的特点,将基本实验技术侧重于细胞组分的原位定性分析、细胞培养、细胞组分离分析和细胞分选与分析技术等实验内容。

第三部分是细胞的结构、功能与生命活动。希望能在一定程度上验证细胞生物学授课的某些内容,但更多的是培养学生分析与解决问题的能力,掌握科学的研究方法,培养正确的科学态度。

实验的可操作性是安排实验内容的前提,但有些希望学生了解,且较为重要的实验技术和实验内容,因操作上有一定困难或受条件限制,我们以附录编入书中,作为拓展实验。其中有些制成录像短片。

三、本书的使用

为了便于同学和老师对本书的使用,我们在学生用书《细胞生物学实验指南》(以下简称《指南》)中,将总共 30 个实验、9 个附录分别纳入 16 个主题,各用书高校可根据自身教学资源条件和实验教学时间进行自主选择。《指南》中给学生推荐 1~2 篇阅读文献是希望学生在课前或课中阅读的,文献阅读对培养一位科学工作者是至关重要的,只有大量阅读文献才能发现问题、提出问题和设计实验,找出解决问题的办法。对于一个具体实验来讲,将科学的文献阅读与实验操作结合起来,有助于引导学生从单个实验入手,逐渐进入解决实际科学问题的大门。参加实验的同学对“背景与原理”的熟悉,结合文献阅读,有助于激发同学主动获取知识的兴趣,也有利于引导同学“认真操作、积极思考、增长才干”。《指南》中的思考题是为同学提供更多的思考问题和讨论问题的空间。除了按常规实验报告要求撰写外,教师不妨选个别实验要求学生以学术论文的格式和要求撰写实验报告,以了解学术论文撰写格式、层次及语言特点。

为了教师和学生使用方便,更为了共同切磋,本书附学习卡一张,通过学习卡可访问“《细胞生物学实验指南》资源网站”。网站内容包括实验教材中每一个实验的实验准备要点、实验设计思路及课堂授课要点、实验结果与讨论、思考题参考答案要点、参考文献等,还有部分实验教学的 PPT 课件。此外,我们还专门录制了动物细胞原代与传代培养技术,电子显微镜的结构、应用及超薄切片技术,荧光显微镜技术等录像短片,用于课堂教学的示范或拓展实验。这些录像短片将陆续以光盘的形式单独发行。

本书是由来自全国 10 所高等院校的 17 位富有实验教学经验的教师共同编写完成的。在编写过程中,大家共同讨论、相互交流、群策群力,有时甚至很难说明某一实验的具体撰稿人。特别是上海交通大学曹阳老师在录像短片的编导、拍摄和后期制作中付出了大量的艰苦劳动。录像短片的拍摄还得到了浙江大学、北京师范大学、复旦大学、武汉大学生命科学院的大力支持。感谢乔守怡老师对本书的关切和具体指导。刘春香老师在编写中做了大量的组织工作。

在编写这本实验教材过程中,我们力所能及地进行了一些有益的探索和尝试,但由于我们能力所限和一些客观原因,本书尚有很多不尽如人意之处,我们恳切地希望大家在使用本实验教材过程中,能够提出宝贵的意见。我们也打算再接再厉,通过共同实践和积累,使这本实验教材更能适合细胞生物学的学科发展和高校创新型人才培养的需要。

丁明孝,王喜忠
2008 年 10 月 12 日

目 录

第一部分 显微镜的使用

- 实验 1 普通光学显微镜的基本使用方法 3
附录:石蜡切片和苏木精-伊红染色法 9
- 实验 2 相差、干涉差、暗视野显微镜的基本使用方法 14
- 实验 3 荧光显微镜的基本使用方法 20
附录 1:绿色荧光蛋白(GFP)标记蛋白质定位的常规实验方法 27
附录 2:激光共聚焦显微镜的基本原理和应用简介 32
- 实验 4 电子显微镜技术(负染色技术) 35

第二部分 基本实验技术

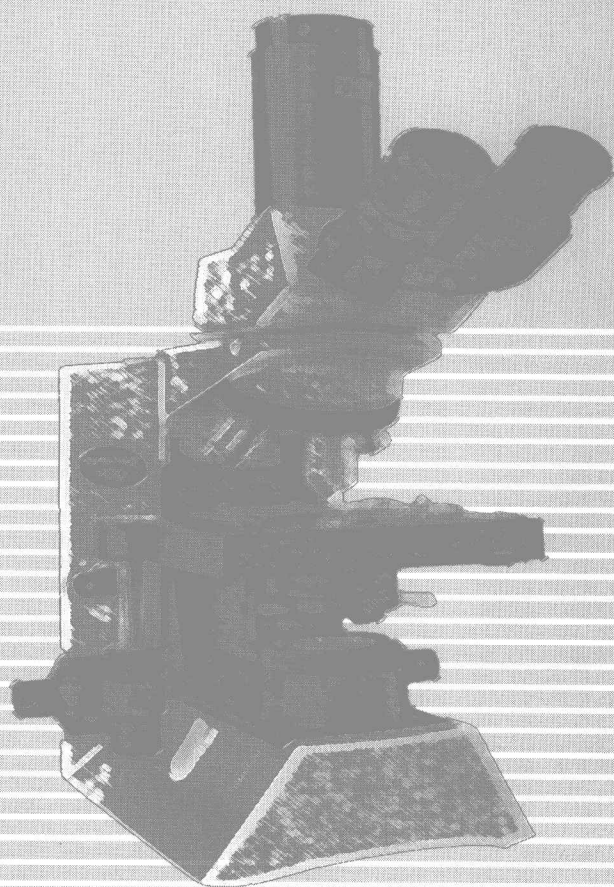
- 实验 5 细胞化学 43
I. 福尔根(Feulgen)染色 43
II. 酸性磷酸酶的检测 47
- 实验 6 免疫标记与核酸原位杂交 51
I. 免疫酶标法检测细胞骨架蛋白 52
II. 免疫荧光标记法检测细胞中的微管蛋白 53
III. 小鼠 3T3 细胞中 28S rRNA 的检测 55
- 实验 7 细胞器的分离、纯化和鉴定 61
I. 差速离心法分离线粒体 61
II. 叶绿体的密度梯度离心与荧光观察 64
附录:肝组织细胞核的制备 66
- 实验 8 细胞融合 68
植物原生质体制备与融合 68

附录 1:早熟染色体凝集(PCC)	71
附录 2:单克隆抗体的制备	74
实验 9 动物细胞培养	81
附录 1:培养细胞的冻存与复苏	84
附录 2:无菌操作技术要领	85
实验 10 细胞分选与分析——流式细胞仪的使用	87
第三部分 细胞的结构、功能与生命活动	
实验 11 细胞质膜及其特化结构	97
I. 细胞质膜通透性效应的观察	97
II. 四膜虫纤毛的再生	99
III. 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的观察	102
实验 12 细胞骨架	105
I. 免疫荧光标记法观察微管的分布	105
II. 鬼笔环肽标记法观察微丝的分布	108
III. 黑藻细胞的胞质环流	111
IV. 细胞骨架的立体镜观察	115
实验 13 细胞周期	118
I. 小鼠 M 期染色体的制备与观察	118
II. S 期细胞的检测	121
III. 细胞周期中组蛋白 H3 磷酸化的检测	124
附录:细胞周期中 DNA(或组蛋白)含量的流式细胞仪检测	127
实验 14 细胞分化	130
I. 植物细胞的脱分化与再分化	130
II. 血细胞的分化和不同类型血细胞的观察	133
实验 15 细胞凋亡与细胞衰老	138
I. 细胞凋亡的诱导及检测	138
II. 细胞衰老的诱导及 β -半乳糖苷酶染色观察	144
实验 16 细胞信号转导	147
I. G 蛋白耦联受体信号通路与心肌细胞的收缩	147
II. TGF β 对斑马鱼胚胎发育的影响	152
附录 实验材料及其培养	156
一、四膜虫	156

- 二、黑藻 157
- 三、斑马鱼 158
- 四、小鼠 160
- 五、拟南芥 162

第一部分

显微镜的使用



实验 1 普通光学显微镜的基本使用方法

一、背景与原理

光学显微镜 (optical microscope) 是利用光学原理把人眼所不能分辨的微小物体放大成像,以供人们提取微细结构信息的光学仪器,是在细胞和组织水平上观察并记录生物结构和生物学现象时最常用的实验设备。绝大多数的生命科学研究需要使用显微镜。近些年,来自不同国别、具有先进性能的各种新型显微镜不断装备着实验室。与过去相比,教学和科研中的显微观察条件得到了普遍的改善。然而,要得到完美的显微观察结果并非易事。大多数照片不同程度地存在视野光不均匀、反差层次欠理想、清晰度不够等缺陷。这些缺陷显然会影响实验结果的质量和可靠性。

在绝大多数情况下,出现类似缺陷的原因并不是显微镜的质量和性能问题,而是我们忽略了显微镜操作的一些细节造成的。只要掌握了光学显微镜的基本调节方法并在使用显微镜时形成习惯,就可以有效地克服上述问题,最大限度地发挥各种新型显微镜的优越性能。

显微镜是一种利用透镜成像原理将实物放大成像的光学装置。其基本的成像原理如图 1-1 所示。我们在显微镜里所看到的是样品放大的虚像。最早的显微镜结构很简单,即由目镜和物镜两块透镜构成。现代的显微镜虽然基本的成像原理不变,但镜体中包含了很多的先进技术。这些技术的应用大大地提高了显微镜的解像度和观察舒适性。

本实验着重讲解柯勒(Koehler)照明的调节和孔径光阑的使用。要求学生通过观察效果的对比,切实体验光路、Koehler 照明和孔径光阑的调节对观察效果的影响,做到不仅看得见,而且要看到最佳效果。

二、实验目的

1. 了解普通光学显微镜的简单结构原理、使用方法和维护方法;
2. 熟练掌握普通光学显微镜的使用特别是显微镜调试中的关键步骤——显微镜的合轴。

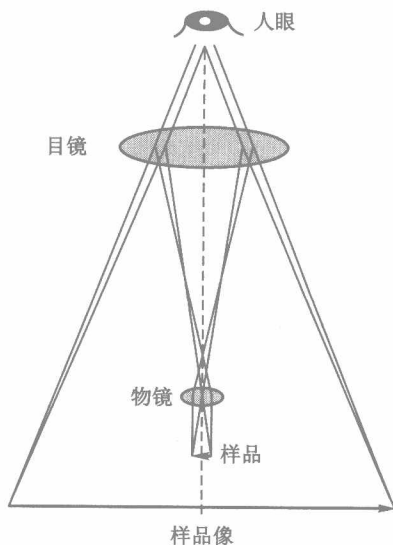


图 1-1 显微镜的基本成像原理

三、教学安排

实验时间为 2~3 学时。本实验强调规范使用和调试普通光学显微镜是细胞生物学实验非常重要的内容,是获得好的实验结果的基础。训练学生熟练使用显微镜后,安排学生 2~3 人一组着重进行合轴的训练。

四、实验材料、仪器与试剂

实验仪器

普通光学显微镜,擦镜纸,待观察的标本片,载玻片,盖玻片,镊子和吸水纸等。

五、实验方法与步骤

1. 显微镜的主要结构

普通光学显微镜的结构主要分为 3 部分:机械部分、照明部分和光学部分(图 1-2)。机械部分包括:镜座、镜柱、镜臂、镜筒、物镜转换器(旋转器)、镜台(载物台)和调节器等。调节器是装在镜柱上的两种大小螺旋,调节时使镜台作上下方向的移动,包括粗调节器(粗螺旋)和细调节器(细螺旋)。细调节器旋转时可使镜台缓慢地升降,多在运用高倍镜时使用,从而得到更清晰的物像,并借以观察标本的不同层次和不同深度的结构。照明部分包括:光源部分(反光镜或电光源)和集光器。光学部分由目镜和物镜组成。目镜装在镜筒的上端,通常备有 2~3 个,上面刻有 5×、10×或 15×符号以表示其放大倍数,一般装的是 10×的目镜;物镜装在镜筒下端的旋转器上,一般有 3~4 个物镜,其中最短的刻有“10×”符号的为低倍镜,较长的刻有“40×”符号的为高倍镜,最长的刻有“100×”符号的为油镜,此外,在高倍镜和油镜上还常加有一圈不同颜色的线,以示区别。在物镜上,还有镜口率(N.A.)的标志,它反映该镜头分辨力的大小,其数字越大,表示分辨率越高,各物镜的镜口率如表 1-1 所示。

表 1-1 各倍数物镜的工作值

物镜	镜口率(N.A.)	工作距离/mm
10×	0.25	5.40
40×	0.65	0.39
100×	1.30	0.11

表 1-1 中的工作距离是指显微镜处于工作状态(物像调节清楚)时物镜的下表面与盖玻片(盖玻片的厚度一般为 0.17 mm)上表面之间的距离,物镜的放大倍数愈大,它的工作距离愈小。显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数与目镜的放大倍数的乘积,如物镜为 10×,目镜为 10×,其放大倍数就为 10×10=100。

2. 校正光轴

目前显微镜普遍采用 Koehler 照明法,这是一种最佳的中心亮视野照明方法。显微镜是共轴光学系统,因此安装好显微镜后必须进行合轴调整。校正光轴的意义在于使物镜、目镜、聚光镜的主光轴和可变光阑的中心点重合在一条直线上,所以又叫做合轴调节或中心调节。如果光轴歪斜,会使像差增大,分辨率和清晰度都要下降。检查方法是将可变光阑开至最大,

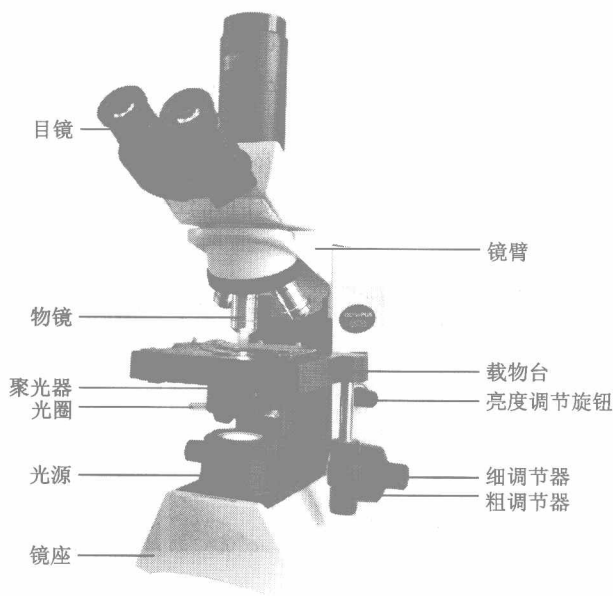


图 1-2 显微镜的结构

把低倍物镜旋入光轴,降低镜筒,使物镜与载物台之间的距离小于该物镜的工作距离(5 mm 以下)。不放标本,调节光源亮度,使视场最亮;或调节光源灯的亮度,使视场明暗合适。然后,从目镜观察或者拔掉目镜直接从镜筒中观察。一边把可变光阑慢慢缩小或打开数次,当光阑关至最小时,光阑的像(此时只有一点点)应正好落在物镜通光孔的中心。当光阑开大到一定程度时,光阑孔的像应正好与物镜通光孔的黑圈相重合。若符合上述两个条件,说明它们“合轴”。否则,就需要调整。

(1) 照明光源的合轴调节

现代显微镜的照明光源灯壳或灯室都有合轴调整螺旋和会聚透镜。将灯管或灯泡点燃之后首先在孔径光阑上放置一张毛玻璃片。用两支合轴调整螺旋使光源照明中心光束照射到孔径光阑中心部位。第二步是用把手扳动会聚透镜,使之前后移动。直到在孔径光阑的毛玻璃片上看到清晰可辨的螺状灯丝的扇形正面影像为止,而且灯丝的位置应在毛玻璃片的中央(图 1-3)。

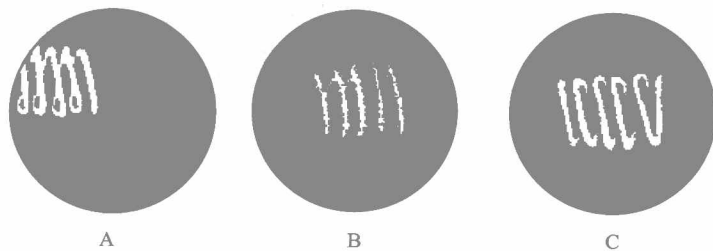


图 1-3 照明光源的合轴调节(舍英)

A. 灯丝位于孔径光阑边缘 B. 调节合轴调整螺旋使灯丝至中央 C. 调节会聚透镜把手使灯丝影像清晰

(2) 孔径光阑的合轴调节

孔径光阑的作用是用来调节聚光镜的数值孔径,使其与物镜的数值孔径做出适当的配合,以取得最佳的分辨率。数值孔径与分辨率有密切关系(图 1-4),所以聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径要相匹配,例如孔径光阑的合轴调节,通过光阑调节杆,通常低数值孔径的物镜要配合低数值孔径的聚光镜,反之高数值孔径的油镜要配合高数值孔径的聚光镜。这样才能提高图像的分辨率。一般来说,孔径光阑的数值孔径等于物镜的数值孔径的 60%~80%。

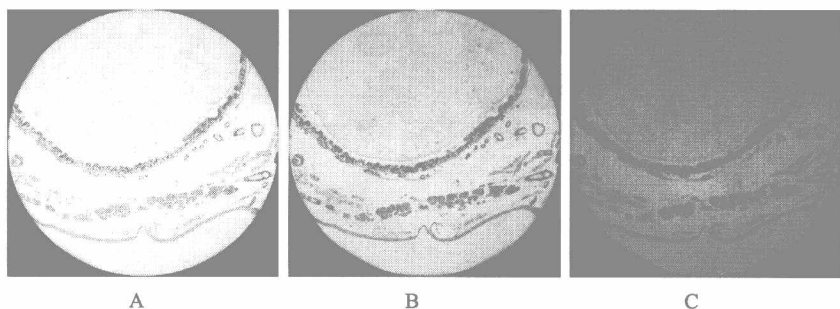


图 1-4 不同数值孔径对图像质量的影响

- A. 孔径光阑开得大,视野亮,杂散光和眩光多,对比度差
- B. 孔径光阑适当,分辨率和反差合适,图像清晰,对比度高
- C. 孔径光阑过小,视野暗,成像细节不清楚

(3) 聚光镜的位置合轴调节

聚光镜是照明光路中的重要部件之一(图 1-5),调节得不好会使视野中常因杂散光的影响而产生眩光或灰蒙蒙的效果。其实聚光镜系统的调节至关重要,调节得好坏,可以直接影响到显微镜视野照明的均匀性,也可以影响显微镜的分辨率,直接影响图像的反差。

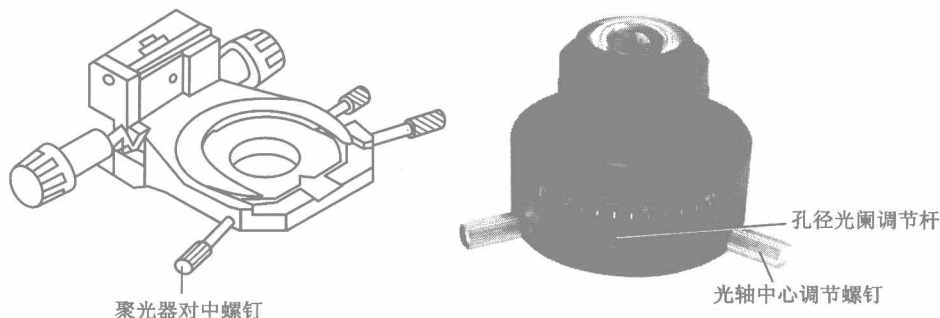


图 1-5 聚光镜的结构

① 调出清晰的多边形:将视场光阑和孔径光阑调到最小的状态,如果显微镜的状态正确,此时在视野中应该可以看到一个边缘清楚的多边形(图 1-6)。

如果看到的不是一个边缘清楚的多边形,则说明光路中的聚光镜上下位置不准确。此时转动聚光镜的上下调节旋钮,使聚光镜缓慢上升或下降,使得视场中形成一个边缘清晰的多边形。(有时如果找不到多边形,可以将视场光阑稍微放大,在稍亮的情况下就可以找到。)

② 多边形调到正中心:视野中的多边形的正确位置应该是在视野的正中心,如果不在正中心说明光路有偏移,需要调节聚光器对中螺钉,即两个银色的旋钮,使多边形在视野的中心。

③ 多边形调成外切:将视场光阑慢慢放大,当多边形正好外切于视场的时候就是视场光阑的最佳工作位置。这样,聚光镜的光轴就调到了与照明光路以及成像光路的光轴合轴(图1-7)。调节好后,日常使用中不要随意调对中螺钉!

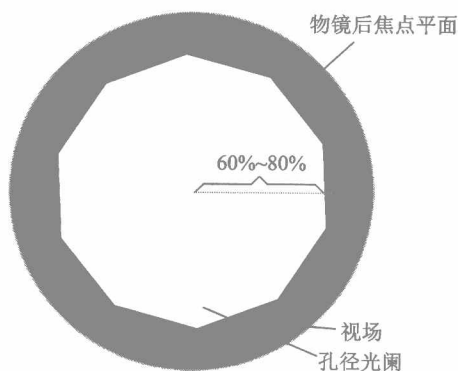


图 1-6 视野中的多边形图案

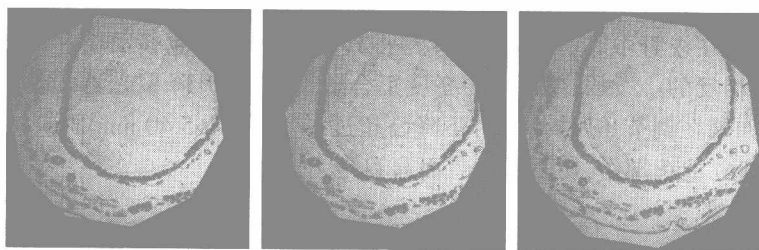


图 1-7 聚光镜的调节

3. 样本的观察

观察前,将显微镜从显微镜柜或镜箱内拿出,用右手紧握镜臂,左手托住镜座,平稳地将显微镜搬运到实验桌上。将显微镜放在自己身体的左前方,离桌子边缘约 10 cm,右侧可放记录本或绘图纸。

(1) 调节光照

不带光源的显微镜,可利用灯光或自然光通过反光镜来调节光照(图1-8),但不能用直射阳光,直射阳光会影响物像的清晰度并刺激眼睛。将 10×物镜转入光孔,将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置,用左眼观察目镜中视野的亮度,转动反光镜,使视野的光照达到最明亮、最均匀为止。光线较强时,用平面反光镜;光线较弱时,用凹面反光镜。自带光源的显微镜,可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

(2) 低倍镜观察

在使用高倍镜或油镜观察前,先用低倍镜找到目标位置。取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。以左手按逆时针方向转动粗调节器,使镜台缓慢地上升至物镜距标本片约 5 mm 处,应注意在上升镜台时,切勿在目镜上观察。一定要从右侧看着镜台上升,以免上升过多,造成镜头或标本片的损坏(图1-9)。然后,两眼同时睁开,用左眼在目镜

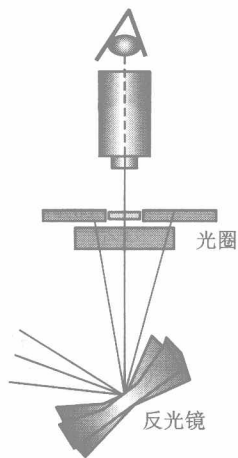


图 1-8 通过反光镜调节光照

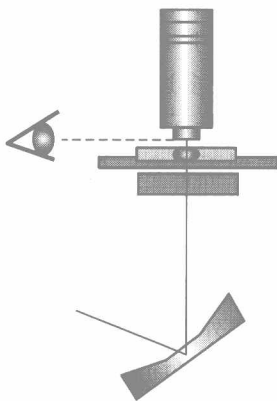


图 1-9 上升镜台

上观察,左手顺时针方向缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心(注意移动玻片的方向与视野物像移动的方向是相反的)。如果视野内的亮度不合适,可通过升降聚光器的位置或开闭光圈的大小来调节。如果在调节焦距时,镜台下降已超过工作距离($>5.40\text{ mm}$)而未见到物像,说明此次操作失败,则应重新操作,切不可心急而盲目地上升镜台。

(3) 高倍镜观察

在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心,同时把物像调节到最清晰的程度,才能进行高倍镜的观察。转动转换器,调换上高倍镜头,转换高倍镜时转动速度要慢,并从侧面进行观察(防止高倍镜头碰撞玻片),如高倍镜头碰到玻片,说明低倍镜的焦距没有调好,应重新操作。调节焦距:转换好高倍镜后,用左眼在目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像,可将细调节器的螺旋逆时针移动 $0.5\sim 1$ 圈,即可获得清晰的物像。(切勿用粗调节器!)如果视野的亮度不合适,可用聚光器和光圈加以调节,如果需要更换玻片标本时,必须顺时针(切勿转错方向)转动粗调节器使镜台下降,方可取下玻片标本。

六、实验提示与注意事项

1. 必须熟练掌握并严格执行使用规程。
2. 取送显微镜时一定要一手握住镜臂,另一手托住镜座。显微镜不能倾斜,以免目镜从镜筒上端滑出。取送显微镜时要轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。
3. 显微镜的工作场所应当清洁、干燥,无震动,无腐蚀性气体存在。台面和凳子的高度要适当。
4. 镜检观察时,即使用单目显微镜,也须两眼同时睁开,用左眼观察。以便右眼绘图或记录。如一只眼睁,一只眼闭,眼睛容易疲劳,无法久看。工作时间较长时,可两眼轮流观察。观察过程中不能随便移动显微镜的位置。