



总主审 高培福

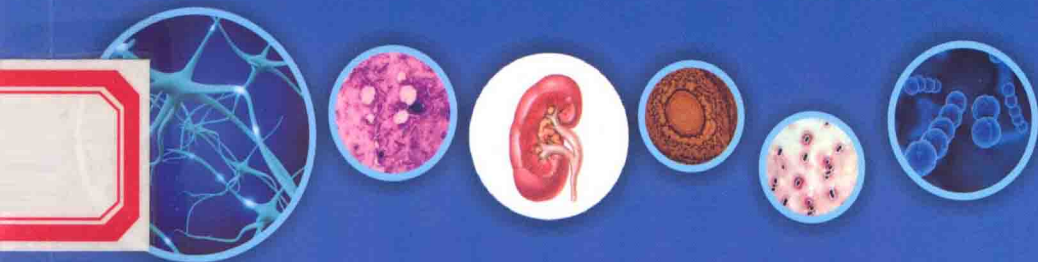
总主编 张 杰

供临床医学、护理学、药学等专业使用



基础医学显微 形态学实验教程 (下册)

朱丽 高淑萍 吕宁 ➡ 主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

供临床医学、护理学、药学等专业使用

基础医学显微 形态学实验教程 (下册)

总主审 高培福

总主编 张 杰

主 编 朱 丽 高淑萍 吕 宁

副主编 张 桥 周道清 宋小珍

编 者 (以姓氏笔画为序)

王俊伟 吕 宁 朱 丽 孙云鹏

李桂芝 宋小珍 张 杰 张 桥

张永红 周道清 高淑萍



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

为了适应医学教育的发展,满足教学的需要,依据教学改革课程教学大纲的最新要求,我们编写了《基础医学显微形态学实验教程(下册)》。本书内容包括医学细胞生物学实验、医学遗传学实验、医学微生物学实验、人体寄生虫学实验及相关附录,编写中强调不同学科实验项目之间的联系,避免重复实验,同时突出本书中相关的形态学科特点,图文并茂。

本书可供综合性大学、农林、医学、师范类本科院校的相关专业使用,也可供相关研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基础医学显微形态学实验教程(下册)/朱 丽 高淑萍 吕 宁 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013. 7
ISBN 978-7-5609-9172-6

I. 基… II. ①朱… ②高… ③吕… III. 人体形态学-显微术-实验-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 132176 号

基础医学显微形态学实验教程(下册)

朱 丽 高淑萍 吕 宁 主编

策划编辑:陈 鹏
责任编辑:陈 鹏
封面设计:范翠璇
责任校对:刘 竣
责任监印:周治超
出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)
武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915
录 排:华中科技大学惠友文印中心
印 刷:湖北新华印务有限公司
开 本:880mm×1230mm 1/16
印 张:7.75
字 数:257 千字
版 次:2013 年 7 月第 1 版第 1 次印刷
定 价:29.80 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

总序

高等医学教育的目标是培养医学理论基础扎实、实践能力强、富有创新精神和高尚品格的高素质医学应用人才。在高素质医学应用人才的培养过程中,基础医学实验教学是其中重要环节之一,它不仅培养学生的实验技能,而且也培养学生的创新能力和严谨的科学态度,使学生的知识结构、思维能力、实践能力和创新能力全面协调发展。

基础医学教育改革的主要目标之一是改变传统的以教师为中心的教学模式,构建一种既能体现教师的指导作用又能充分发挥学生自主学习作用的新型教学模式,并在此基础上实现实验教学内容体系、教学手段及教学方法的全面改革。传统的形态学实验教学基本上是以学科为中心的教学模式,使人体系统的完整知识被分割隶属于不同的学科和课程,实验教学基本上依附于理论教学,多为重复性、验证性实验。而且由于授课时间先后的不同,使形态学课程之间存在的必然的内在联系不易在同一时段有效体现,造成了前期课程和后续课程的衔接不良、知识体系的脉络分割等弊端。因此,建立新的形态学科实验教学模式,在整体教学设计上,全面整合和优化教学内容,打破学科界线,密切基础教学与临床教学之间以及形态学科间的相互联系,创建以学生为主体的教学环境,围绕自主学习进行改革十分必要。

本系列实验教材涉及组织与胚胎学、病理学、细胞生物学、遗传学、医学微生物学、医学寄生虫学等多门课程,淡化了原有的学科界限而强调内容的系统性、完整性和实用性。既有经典的验证性实验,也有综合性实验,内容上的创新表现于文字简明扼要、图文并茂,实用性表现于实验项目中设置了相关的临床病例及讨论,对培养学生独立思考、分析问题、解决问题的能力,提高学生的自主学习能力,进一步密切医学基础课程与临床课程间的联系,建立完整的医学科学体系将起到较好的推动作用。

本系列实验教材的编写将进一步促进高等医学院校实验教学的改革、探索和研究。本教材既具有一定的创新性和前瞻性,又具有很好的实用价值和参考价值,对培养高素质“技能型”、“应用型”人才将发挥积极的作用。



原山东医科大学校长
山东省高等医学教育研究中心主任
2013年4月于济南

前言

为了适应医学教育的发展,满足教学的需要,我们依据教学改革课程教学大纲的最新要求,编写了《基础医学显微形态学实验教程(下册)》。本书内容包括医学细胞生物学实验、医学遗传学实验、医学微生物学实验、人体寄生虫学实验及相关附录,编写中强调不同学科实验项目之间的联系,避免重复实验,同时突出实验课的形态学科特点,图文并茂,标本丰富多彩。

医学细胞生物学实验部分从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面设置了 12 个实验项目,旨在培养学生的基本实验技能和综合创新能力。其内容包括普通光学显微镜的结构和使用、动物细胞基本形态与结构观察、细胞中微丝的显示与观察、线粒体的超活染色、动物细胞超微结构观察、细胞有丝分裂和减数分裂观察、细胞膜通透性观察、细胞吞噬、细胞融合、细胞中核酸的显示与观察、细胞培养技术、细胞计数。内容紧密结合实际教学过程,可操作性强。

医学遗传学实验分为细胞遗传学实验(人类染色体标本制备、人类染色体非显带的核型分析、人类染色体 G 显带核型分析、X 和 Y 染色质标本的制作与观察)、群体遗传学实验(人类皮纹分析、苯硫脲(PTC)尝味实验)和临床遗传学实验(系谱分析和再发风险估算、Bayes 算法)三大部分。所编实验均为教学和科研工作中的经典实验,实验方法简单,实用性强,有利于实际教学。

医学微生物学实验主要包括形态学实验、基本操作技能实验、验证性实验三大类。编写过程中力求体现实用性和科学性,与理论知识紧密结合,内容简明扼要。

人体寄生虫学实验课以观察镜下标本、大体标本、仿真视频、病例分析及中间宿主为主,仿真视频提供了大量的寄生虫的清晰画面和寄生虫的活动图像,弥补了实物标本的不足。本书将寄生虫结构图像和文字说明有机结合起来,可调动学生学习的积极性。

本书的编写得到了编者所在单位及领导的大力支持,在编写中参考和引用了国内有关专家的资料,在此一并表示诚挚的感谢。

由于编者水平有限,时间仓促,书中肯定有不少问题,恳请广大师生在使用过程中批评指正。

本书可供综合性大学、农林、医学、师范类本科院校的相关专业使用,也可供相关研究人员参考。

编者

目 录

第一章 医学细胞生物学实验	/ 1
第一节 普通光学显微镜的结构和使用	/ 1
第二节 动物细胞基本形态与结构观察	/ 5
第三节 细胞中微丝的显示与观察	/ 7
第四节 线粒体的超活染色	/ 9
第五节 动物细胞超微结构观察	/ 10
第六节 细胞有丝分裂和减数分裂观察	/ 11
第七节 细胞膜通透性观察	/ 13
第八节 细胞吞噬	/ 15
第九节 细胞融合	/ 16
第十节 细胞中核酸的显示与观察	/ 17
第十一节 细胞培养技术(电教课)	/ 19
第十二节 细胞计数	/ 20
第二章 医学遗传学实验	/ 22
第一节 人类染色体标本制备	/ 22
第二节 人类非显带染色体的核型分析	/ 23
第三节 人类染色体 G 显带核型分析	/ 25
第四节 X 和 Y 染色质标本的制作与观察	/ 29
第五节 人类皮纹分析	/ 31
第六节 系谱分析和再发风险估算	/ 35
第七节 苯硫脲(PTC)尝味实验	/ 37
第八节 Bayes 算法	/ 38
第三章 医学微生物学实验	/ 41
第一节 细菌形态结构的观察	/ 41
第二节 细菌形态学检查法	/ 45
第三节 细菌的接种方法与一般培养法	/ 49
第四节 细菌的生化反应检测	/ 53
第五节 细菌分布及外界因素对细菌的影响	/ 55
第六节 药敏试验	/ 57
第七节 病原性球菌实验	/ 60
第八节 肠道杆菌实验	/ 61
第九节 浅部真菌检查及其他微生物形态观察	/ 63
第十节 综合性试验	/ 64
第四章 人体寄生虫学实验	/ 68
第一节 医学原虫	/ 68
第二节 吸虫	/ 79
第三节 绦虫	/ 88



第四节 线虫	/ 95
第五节 节肢动物	/ 110
附录 溶液配制	/ 114
参考文献	/ 118



的光线很少,视野很暗,物像不清晰。在镜头和玻片(玻璃折光率 $n = 1.5150$) 之间滴加香柏油 ($n = 1.5148 \sim 1.5152$),因为香柏油的折光率与玻璃的折光率接近,所以可明显降低空气对光的折射作用,使进入油镜的光线增多,观察视野的亮度增加,呈现出清晰的物像,见图 1-2。

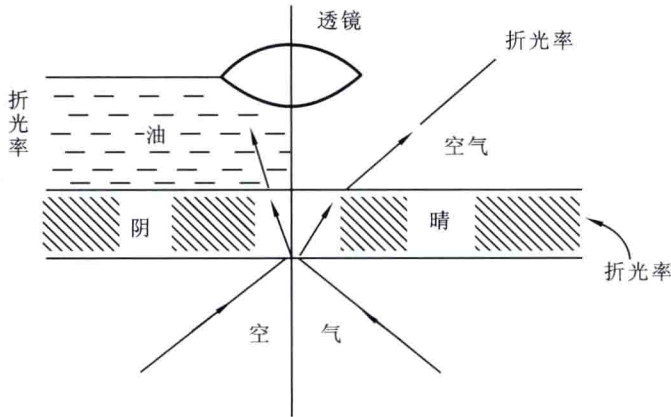


图 1-2 油镜原理图

(三) 光学显微镜的结构

光学显微镜主要由机械部分、照明部分和光学部分三部分组成,见图 1-3。

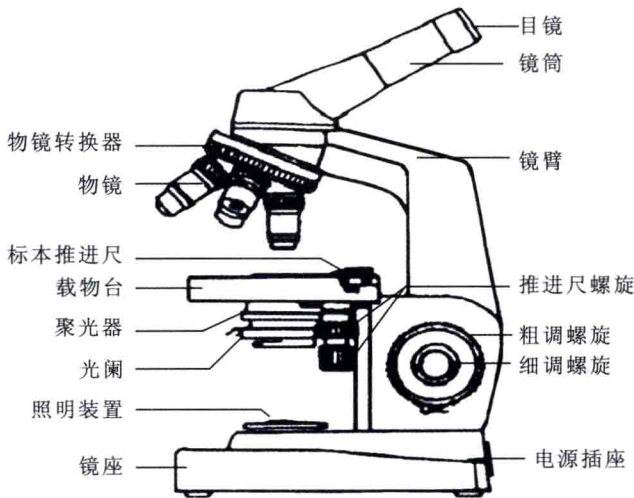


图 1-3 光学显微镜结构图

1. 机械部分

- (1) 镜座:显微镜的底座,稳定和支持整个镜体。
- (2) 镜臂:取放显微镜时手握此臂。
- (3) 镜筒:镜臂前上方的圆筒,镜筒上端安装目镜,镜筒下端安装物镜转换器。
- (4) 物镜转换器:镜筒下方的圆盘状部件,盘上有 3~4 个圆孔,安装了不同放大倍数的物镜,转动物镜转换器可更换不同放大倍数的物镜。
- (5) 载物台:放置标本片的平台,上有标本推进尺,通过旋转标本推进尺螺旋可前、后、左、右移动标本片。
- (6) 调焦装置:装在镜臂两侧的粗调螺旋和细调螺旋。

- ① 粗调螺旋:转动时可使载物台大幅度升降,迅速调节物镜和标本间距离使物像出现在视野中。
- ② 细调螺旋:转动时可使载物台短距离升降以得到更清晰的物像。

2. 照明部分

照明部分安装在载物台下方,包括反光镜、聚光器、光阑。

(1) 反光镜:安装在镜座上的平、凹两面镜,可任意方向转动,将光线射到聚光器,凹面镜聚光作用强,光线较弱的时候使用;平面镜聚光作用弱,光线较强时使用。电光源显微镜一般在镜座内安装有照明装置,光线的强弱由底座上的亮度调节钮控制。

(2) 聚光器:由一组透镜组成,汇聚光线使其照射到标本上,升降聚光器可以调节视野中光的强弱。

(3) 光阑:在聚光镜的下方,由一组金属薄片组成,其外侧伸出一柄,拨动其可调节其上孔的大小,控制通过的光量。

3. 光学部分

(1) 目镜:安装在镜筒上端,通常备有 2~3 个,上刻有“5×”、“10×”、“15×”等字样,表示放大倍数,一般选用“10×”。

(2) 物镜:安装在物镜转换器上,一般有 3~4 个物镜。通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数和数值孔径(也称镜口率),如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.30 等;镜筒长度和所要求的盖玻片厚度,如 160(mm)/0.17(mm)。不同放大倍数物镜的比较见表 1-1。

表 1-1 不同放大倍数物镜的比较

镜 头	放 大 倍 数	镜 身	数 值 孔 径	工作距离/mm
低倍镜	10	短	0.3	7
高倍镜	40	较长	0.5	0.5
油镜	100	长	1.3	0.2

① 数值孔径(numerical aperture, NA):物镜的主要技术参数,是判断其性能高低的重要标志。其数值的大小反映该物镜分辨率的大小,数值越大分辨率越高。

② 分辨率:指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力,这个可分辨的最小间隔距离越近,分辨率越高。人眼的分辨率可达 0.1 mm,显微镜的分辨率能达到 0.2 μm。

分辨率与数值孔径的关系:

$$R=0.61\lambda/NA$$
$$NA=n \cdot \sin(\alpha/2)$$

上述式中, R 为分辨率, λ 为光波波长, NA 为数值孔径, n 为介质折射率, α 为透镜的孔径角。

③ 工作距离:指显微镜处于工作状态(物像调节清晰)时物镜前透镜的表面到被检标本之间的距离。平时所说的调焦,实际上是调节工作距离。物镜的放大倍数越大,工作距离越小。不同放大倍数物镜的工作距离见图 1-4。

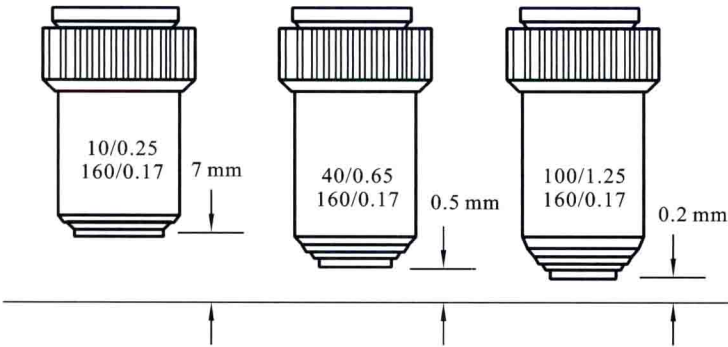


图 1-4 不同放大倍数物镜的工作距离

④ 分辨率和放大倍数对成像的影响:显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。分辨率和放大倍数是两个不同但又有联系的概念。当选用的物镜数值孔径不够大,即分辨率不够高时,显微镜不能分清物体的微细结构,此时即使过度地增大放大倍率,得到的也只能是一个轮廓虽大但细节不清的图像。反之,如果分辨率已满足要求而放大倍率不足,则显微镜虽已具备分辨的能力,但因图像太小而仍然不能被人眼清晰看见。显微镜的分辨率是由物镜的数值孔径决定的,目镜只是起放大作用。因此,对于物镜不能分辨出的结构,目镜放大倍率再高,也仍然不能分辨出。



(四) 光学显微镜的使用步骤与日常养护

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置:取显微镜时,右手握镜臂,左手托镜座,将其轻放在操作者略偏左侧,显微镜应离实验台边缘至少一拳的距离。

(2) 对光:转动粗调螺旋,使载物台与物镜距离拉开,转动物镜转换器,使低倍镜对准通光孔,打开光阑,上升聚光器,将反光镜凹面对准光源,一边在目镜上观察,一边调节反光镜方向,直到视野内的光线明亮均匀。若使用电光源显微镜,首先打开电源开关,然后使低倍镜对准通光孔,开大光阑,上升聚光器使视野明亮均匀。

(3) 放置标本片:取标本片,盖玻片面朝上放在载物台上,旋转标本推进尺螺旋移动标本片将观察部位移到通光孔的正中。

(4) 调节焦距:从显微镜侧面注视着物镜头,同时缓慢转动粗调螺旋,使载物台上升至物镜距标本片约 5 mm 处,然后一边在目镜上观察,一边缓慢转动粗调螺旋,使载物台缓慢下降,直至视野中出现清晰的物像。

如果看不到物像,可能由以下原因造成:①物镜未对正通光孔,应对正后再观察;②标本未放到视野内,应移动标本至通光孔中央;③粗调螺旋转动太快,超过焦点,应重新调焦;④视野内光线太强,不易观察到未染色的标本片,将光线调暗一些再观察。

2. 高倍镜的使用方法

(1) 选好目标:一定要先在低倍镜下把待观察部位移动到视野中心,将物像调节清晰。

(2) 转换高倍物镜:为防止镜头碰撞玻片,从显微镜侧面注视着,慢慢的转动转换器使高倍物镜头对准通光孔。

(3) 调节焦距:向目镜内观察,一般能见到一个模糊的物像,稍稍调节细调螺旋,即获得清晰的物像。若视野亮度不够,可上升聚光器和开大光阑。

3. 油镜的使用方法

(1) 选好目标:必须先在低倍镜、高倍镜下观察,将待观察部位移到视野中心。

(2) 转换油镜:转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,玻片标本观察部位滴一滴香柏油,然后从侧面注视着镜头与玻片,转动镜头转换器使油镜头浸入油中。

(3) 调焦:一边观察目镜,一边稍稍调节细调螺旋,使物像清晰。如果目标不理想或不出现物像,需要重找目标,在加油区内重找目标应按先低倍镜后油镜的顺序,以免污染高倍镜的镜头。

(4) 擦净油镜的镜头和标本片:转动粗调螺旋下降载物台,将油镜头旋出,先用擦镜纸擦去香柏油,再用擦镜纸沾取少许二甲苯顺镜头直径方向反复擦拭 5~6 次,不要沿镜头的圆周擦,最后用干净的擦镜纸把残留的二甲苯擦掉,再以同样的方法擦净标本片。

4. 显微镜的维护

(1) 各部分结构不得随意拆卸,以免损坏。

(2) 取送搬迁显微镜时,要一手持镜臂,一手托镜座,平端胸前,轻拿轻放。

(3) 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、酒精等对机件有损坏作用的化学药品与显微镜接触。

(4) 光学部分,必须保持清洁,且避免日光直射。

(5) 使用细调螺旋时,要缓慢来回旋转。

(6) 油镜使用后应立即用擦镜纸拭去镜油,若油迹未擦干净,应先将二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头,再用干净擦镜纸擦去镜头上残留的二甲苯。低、高倍镜的镜头可用软绸布擦拭,不能用硬布(纸)擦拭。

注意:二甲苯应尽量少用,以免渗入油镜内溶解用于黏固透镜的胶质,造成透镜移位或脱落。

(7) 显微镜镜头擦净后,各物镜头转成“八”字形,降低载物台与聚光器。用软绸布拭净各部件后,套好外罩,放入镜箱内或送至显微镜室。

【实验讨论及作业】

(1) 显微镜下看到的物像的方向是否与样品方向一致?

- (2) 样本移动方向是否与物像移动方向一致?
- (3) 使用显微镜观察标本时,为什么必须按照从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?
- (4) 如果标本玻片放反了,可用高倍镜或油镜找到清晰的标本物像吗?为什么?

张 杰 孙云鹏 周道清

第二节 动物细胞基本形态与结构观察

高等动物细胞种类繁多,形态结构各不相同,常与其功能相统一。利用普通光学显微镜对细胞形态结构进行观察,是细胞生物学研究的重要手段。

【实验目的】

- (1) 掌握光镜下细胞的基本形态结构。
- (2) 进一步掌握光学显微镜的使用方法。
- (3) 掌握细胞生物学作图法。

【实验仪器设备及材料】

- (1) 材料:猫小脑切片、蟾蜍上皮切片、狗动脉切片、蟾蜍血细胞涂片、人精液涂片、人血细胞涂片。
- (2) 器材:光学显微镜。

【实验原理】

细胞(cell)是生物体形态结构和功能活动的基本单位。人体及其他高等动物体中具有不同类型的细胞,这些细胞形态结构各异,功能不同,其形态结构与其功能往往相适应。例如,肌细胞一般呈长梭形或条形,有利于细胞收缩;哺乳动物红细胞体积微小,为两面内凹的圆盘状,有利于进行 O_2 和 CO_2 的运输和交换;神经细胞具有树突和轴突,具有感受刺激、传导冲动的功能;人精子具有一根长长的鞭毛,有利于其运动。

虽然不同类型细胞的形态和大小具有明显差异,但在普通光学显微镜下,能够观察到细胞膜(cell membrane)、细胞质(cytoplasm)和细胞核(nucleus)等三个基本结构,这种结构被称为细胞的显微结构。

在细胞生物学的研究过程中,对细胞形态结构的研究是非常重要的一个方面。组织样品在进行光镜检测之前需要进行一系列的加工处理。普通光学显微镜采用可见光作为光源,而细胞总重量的 70% 是无色透明的水,因此有机体的组织和细胞无法直接用普通光学显微镜观察。取材后的有机体组织或细胞,经过固定、包埋、切片及染色后,制作成标本,才能进行光镜观察。

特殊情况下,还需要对观察到的细胞形态结构进行绘图。细胞生物学绘图时,要遵循细胞生物学作图法的要求。

细胞生物学作图法如下。

- (1) 在仔细观察的基础上,选择典型结构进行绘制,要求真实、准确(注意各部分结构比例关系)。
- (2) 用铅笔绘图,线条要明确清晰。颜色的深浅明暗一律用点的疏密来表示,点要圆而一致,不得涂暗影或进行美术加工。
- (3) 各部分结构名称要在一侧引直线注明。各引线要平行,不得有交叉。在图的下方注明细胞名称。
- (4) 每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当,并注意纸面的整洁。

【实验内容】

1. 猫小脑神经细胞

取猫小脑切片(硝酸银染色,横切)置于显微镜下,低倍镜下观察可见有许多突起的小脑神经细胞;油镜观察下可见胞体被染成黄褐色,形态多样(枣核形、三角形)、突起长短不一,细胞内有被染成淡黄色的、大而圆的细胞核。



2. 蟾蜍上皮细胞

取蟾蜍上皮切片(HE 染色)置于显微镜下,低倍镜下观察可见蟾蜍上皮是由排列紧密的多边形扁平细胞组成的,上皮细胞是排列紧密的多边形柱状细胞;油镜下观察可见颜色较浅的细胞外界,细胞核位于细胞的中央,呈圆形,被染成蓝紫色。

3. 狗平滑肌细胞

取狗动脉切片(HE 染色)(图 1-5)置于显微镜下,低倍镜下观察可见许多梭形或长条形的平滑肌细胞;高倍镜下观察可见平滑肌细胞彼此镶嵌排列,细胞核位于细胞的中央,呈长椭圆形或杆状,被染成蓝紫色。

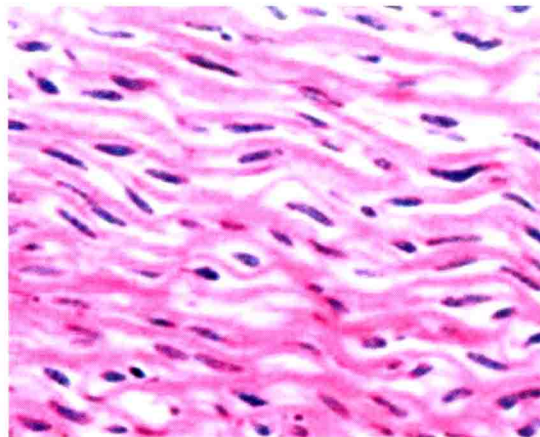
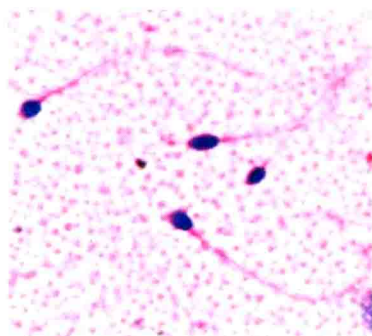


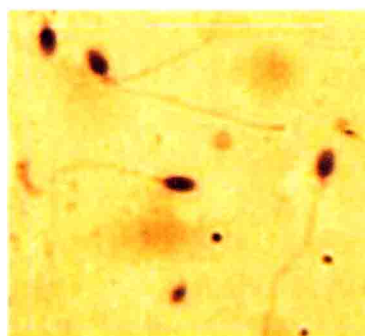
图 1-5 狗动脉切片(HE 染色)

4. 人精子

取人精液涂片(HE 染色或铁苏木素染色)(图 1-6)置于显微镜下,低倍镜下观察可见许多被染成蓝紫色(HE 染色)或黑灰色(铁苏木素染色)的精子;高倍镜下观察可见精子呈“蝌蚪形”,每个精子都具有细长的鞭毛。



(a) HE染色



(b) 铁苏木精染色

图 1-6 人精液涂片

5. 蟾蜍红细胞

取蟾蜍血细胞涂片(HE 染色)(图 1-7)置于显微镜下,低倍镜下观察可见蟾蜍红细胞为椭圆形,细胞质呈浅粉红色,细胞核位于中央,圆形或椭圆形,呈蓝紫色;高倍镜下观察隐约可见核仁。

6. 人血细胞(人红细胞与人白细胞)

取人血细胞涂片(HE 染色)(图 1-8)置于显微镜下,低倍镜下观察可见人红细胞为两面凹的圆饼状,呈浅粉红色,无细胞核结构;人白细胞细胞核呈蓝紫色,细胞质为红色。不同类型的白细胞,其大小和形态不同,核的形态也不同。

【实验注意事项】

(1) 使用油镜时,必须在玻片标本与物镜镜头之间滴加香柏油才能进行观察,使用后应立即用二甲苯将镜头和标本上的香柏油擦净;使用其他物镜时不能滴加香柏油。



图 1-7 蟾蜍血细胞涂片(HE 染色)

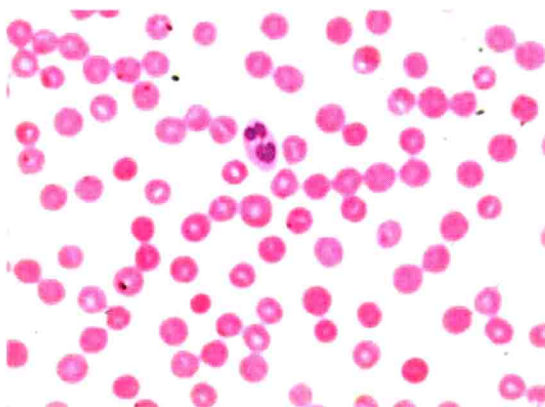


图 1-8 人血细胞涂片(HE 染色)

(2) 使用前首先检查显微镜,使用过程中如果出现故障,切勿私自拆修,各个机件不得用力转动,应立即报告教师协助排除故障。

(3) 显微镜使用完毕,应取出玻片标本,并将接物镜转成“八”字形偏离通光孔,使载物台下降至最低,然后罩上镜罩。

【实验讨论及作业】

- (1) 绘制人精子图。
- (2) 绘制蟾蜍红细胞图。
- (3) 绘制人红细胞图。
- (4) 绘制人白细胞图。
- (5) 举例说明细胞形态与功能的关系。

吕 宁

第三节 细胞中微丝的显示与观察

在光学显微镜下对细胞中的结构进行观察时,需要对样品进行一系列的处理,其中利用固定和染色技术可使细胞中的结构染上颜色,可在光镜下直接观察。

【实验目的】

- (1) 掌握微丝的显示方法。
- (2) 了解光镜下细胞骨架的基本形态结构。

【实验仪器设备及材料】

- (1) 材料:洋葱鳞茎内表皮细胞。
- (2) 器材:光学显微镜、镊子、小平皿、载玻片、吸水纸、37℃恒温箱。
- (3) 试剂:PBS 液(pH7.2)、2%triton X-100 液、M-缓冲液、3%戊二醛液、0.2%考马斯亮蓝染液、30%甘油。

【实验原理】

细胞骨架是真核细胞质中由特异蛋白质组成的纤维网络体系,包括微丝、微管和中间纤维三种基本类型,对于细胞各种生命活动具有非常重要的生理功能。细胞形态的维持、细胞的运动、细胞内物质运输、细胞分裂等都与细胞骨架有关。

微丝是细胞骨架中直径最小的,直径为 5~8 nm,无法在光镜下进行观察,需要通过电子显微镜来观



察。在细胞质中,微丝凝集成束,形成微丝束或应力纤维,直径约为 40 nm,可在光镜下直接观察。1989 年,S. D. Pone 将培养的人皮肤成纤维细胞用考马斯亮蓝染液检测细胞骨架,首次获得成功;1982 年,上海植物生理所陈梓卿采用植物细胞为材料也获得成功。该方法简单易行,被广泛应用。

利用考马斯亮蓝检测细胞骨架,首先要用适当浓度的 triton X-100 溶液(聚乙二醇辛基苯基醚,一种非离子去垢剂)处理细胞,它能够溶解细胞膜上及细胞内的多种蛋白质,而细胞内由微丝聚集形成的微丝束或应力纤维不被破坏,经固定和考马斯亮蓝(非特异性蛋白质染料)染色后,细胞质背景着色弱,有利微丝的显示,可在光镜下观察到由微丝组成的纤维束。

实验中采用磷酸盐缓冲液中含有生理盐水,可使细胞不被破坏,能保持原有状态下的结构;M 缓冲液的目的是稳定 F 肌动蛋白,使得细胞骨架纤维保持聚合状态并且较为舒张,便于观察;戊二醛能固定、较好的保存细胞骨架成分。

【实验内容】

(1) 取材:取洋葱鳞茎内表皮,面积约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$,置于小培养皿中,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 3 min。

(2) 破膜:吸去 PBS,将洋葱表皮细胞浸在 2% triton X-100 液中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱处理 20~30 min,以除掉骨架以外的蛋白质。

(3) 冲洗:吸去 2% triton X-100,立即用 M-缓冲液轻轻地洗涤 3 次,每次 3 min,使细胞骨架稳定。

(4) 固定:在 3% 戊二醛液中固定 10 min,再用 PBS 液洗 3 次,每次 5 min,吸去多余液体。

(5) 染色:滴加 0.2% 考马斯亮蓝染液染色 20 min,自来水冲洗,至自来水不再变蓝。

(6) 制片:将标本平铺在载玻片上,用 30% 甘油封片,镜检。

【实验注意事项】

(1) 撕取洋葱鳞茎内表皮不可带茎肉,样本要展开铺平。

(2) 破膜处理要掌握好时间。

(3) 观察时,选择平展染色适中的部位观察。

【实验讨论及作业】

在普通光学显微镜下可见一些充分伸展的成纤维细胞中,分布着被染成深兰色的细直纤维,这就是由许多微丝聚集成的最大的微丝束,也称应力纤维,它们多沿细胞长轴方向、细胞突起而分布,有些细胞(多角形)中,一组组纤维沿不同方向交叉分布,如在洋葱表皮细胞中可见微丝束交织成网状结构(图 1-9)。

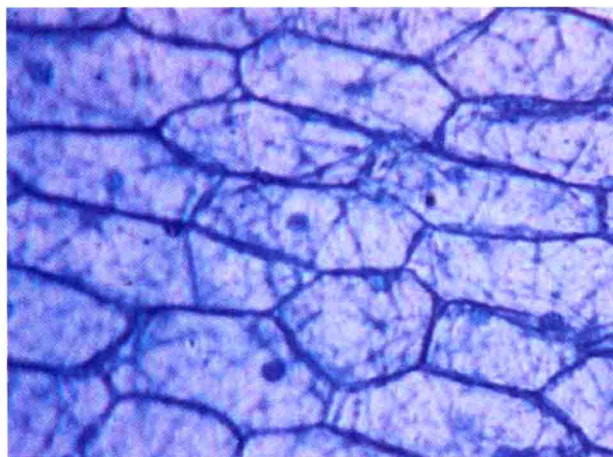


图 1-9 洋葱鳞茎内表皮细胞中微丝束结构

绘制洋葱鳞茎内表皮细胞中微丝的分布图。

第四节 线粒体的超活染色

线粒体是细胞中进行氧化反应的细胞器,通过其氧化反应给细胞提供能量。线粒体的形态多样,其高度可变,可呈杆状、椭圆形或圆形。

【实验目的】

- (1) 观察动植物细胞内线粒体的形态数量与分布。
- (2) 掌握线粒体超活染色技术。

【实验仪器设备及材料】

- (1) 材料:洋葱鳞茎内表皮细胞、人口腔上皮细胞。
- (2) 器材:光学显微镜、镊子、小平皿、载玻片、牙签、吸水纸、37℃恒温箱。
- (3) 试剂:詹纳斯绿 B 染液。

【实验原理】

活体染色是指利用某些无毒或毒性很小的染料对活的生物体的细胞或组织进行着色的一种染色方法。其优点是显示活细胞内的某些结构,而不影响细胞的生命活动和产生任何理化变化以致引起细胞死亡。活体染色技术可用来研究生活状态下的细胞形态结构和生理、病理状态。

根据所用染色剂的性质和染色方法的不同,活体染色可分为体内活染与体外活染两类。体内活染是以胶体状的染料溶液注入动植物体内,染料的胶粒固定于细胞内某些特殊结构内,以达到易于识别的目的。体外活染又称超活染色,是由活的动植物分离出部分细胞或组织小块,以染料溶液浸染,染料因其“电化”特性与被染部分相互吸引被选择固定在活细胞的某种结构中而显色。

但不是任何染料都可作为活体染色剂使用,一般应选择那些无毒或毒性小的碱性染料(如易溶于类脂质)并配成较稀的溶液来使用。詹纳斯绿 B 染液是活体染色中重要的染料,对线粒体有专一性。詹纳斯绿 B 可专一性地对线粒体进行活染,这是由于线粒体内的细胞色素氧化酶系的作用,使染料始终保持氧化状态(即有色状态),呈蓝绿色;而线粒体周围的细胞质中,这些染料被还原为无色。

【实验内容】

- (1) 观察动物肾脏线粒体玻片,了解细胞内线粒体数量、形态及分布。
- (2) 人口腔黏膜上皮细胞线粒体超活染色与观察:①取一滴詹纳斯绿 B 于载玻片中央;②用牙签刮取人口腔黏膜上皮细胞,涂于玻片;③染色 10~15 min,盖上盖玻片,吸去周围染液,显微镜下观察。
- (3) 洋葱鳞茎内表皮线粒体超活染色与观察:①取一滴詹纳斯绿 B 于载玻片中央;②用镊子撕取洋葱鳞茎内表皮,完全浸没于染液中;③37℃恒温水浴中染色 10~15 min,盖上盖玻片,吸去周围染液,显微镜下观察。

【实验注意事项】

- (1) 撕取洋葱鳞茎内表皮不可带茎肉,样本要展开铺平。
- (2) 掌握好詹纳斯绿 B 的染色时间。

【实验讨论及作业】

小鼠肝脏组织细胞中线粒体数量较多,呈灰黑色的圆形或椭圆形颗粒(图 1-10);洋葱鳞茎内表皮细胞中由于存在中央大液泡,线粒体多存在于细胞膜内侧,呈蓝绿色圆形小颗粒(图 1-11);人口腔黏膜上皮细胞中线粒体成杆状、圆形或椭圆形,呈蓝绿色。

观察并完成以下作业。

- (1) 绘制人口腔黏膜上皮细胞、洋葱鳞茎内表皮细胞中线粒体的形态与分布。
- (2) 分析该实验中染色时间对实验结果的影响。

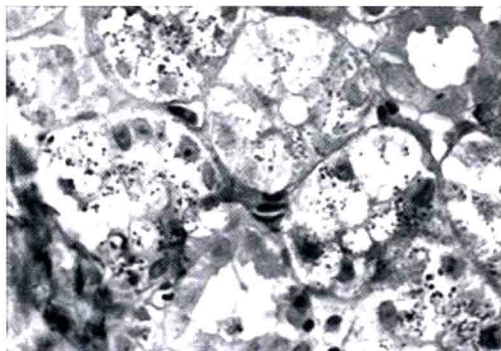


图 1-10 小鼠肝脏(线粒体)



图 1-11 洋葱鳞茎内表皮细胞线粒体(体外活染)

■ 吕 宁 朱 丽 ■

第五节 动物细胞超微结构观察

超微结构,又称亚显微结构,是指在电子显微镜下能够观察到的细胞细微结构。电子显微镜(简称电镜)与光学显微镜相比,具有更高的分辨率和放大倍数,可以观察到细胞更精细的结构。

【实验目的】

- (1) 掌握各种细胞器和细胞结构的超微结构。
- (2) 熟悉电子显微镜的结构、功能和原理。

【实验材料】

电子显微镜技术视频及细胞超微结构图片。

【实验原理】

细胞超微结构是通过电子显微镜技术观察到的。

(一) 透射电子显微镜技术

透射电子显微镜的结构与光学显微镜比较,有以下几点不同。①光源不同:电镜是用电子束(电子流)代替照明的光源,因为电子波的波长远比光波的波长短,所以电镜的分辨率比光学显微镜显著提高,对于生物样品其分辨率可达 2 nm。②透镜不同:电镜使用的是电磁透镜,即由磁或电所形成的磁场或电场的局部空间来起透镜的作用。③成像原理不同:在电镜中,透过被检物的电子束打到荧光屏上,电子能转换成光能,成为我们肉眼可观察的影像。④真空要求不同:电子显微镜由于采用电子束作为光源,高能电子能够与空气中的成分相互作用,因此,电镜的镜筒需保持真空状态。

用于电镜观察的标本,一般为 5 μm 左右的超薄切片。标本的制作过程也要经过固定、脱水、包埋、超薄切片及电子染色等步骤,但包埋剂常用环氧树脂,用超薄切片机切成薄片,然后用醋酸铀及柠檬酸铅等进行染色,以增强细胞结构间的反差。

(二) 扫描电子显微镜技术

扫描电子显微镜也是利用电子枪产生电子,经过电磁透镜汇聚成的电子束,并使电子束在样品上进行扫描,加速的电子与样品互相作用,使样品表面产生“二次电子”,经过收集、放大,在显像管的荧光屏上呈现出样品影像。

扫描电镜的独特优点是能得到有真实感的立体图像,此外,样品可以在样品室内做各方向的水平移动和转动,因此,便于从各种角度进行观察。扫描电镜的分辨本领虽然只有 3 nm 左右,但因有上述优点,故广泛用于观察表面和断面的构造。目前生产的扫描电镜,都附有 X 光微区分析仪或能谱仪,可进行元素成分或含量的测定。

扫描电镜样品的制备因材料和目的不同而有各种方法。其基本过程如下:固定→脱水→干燥→喷镀金属膜。镀膜可增加次生电子,以产生鲜明的影像。

【实验内容】

- (1) 观看电子显微镜技术视频。
- (2) 细胞形态结构多种多样,图示不同形态的真核细胞。观察各种真核细胞的超微结构图片,如人红细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、癌细胞、心肌细胞等。
- (3) 观察各种细胞结构的电子显微镜图片:单位膜、内质网、高尔基复合体、线粒体、细胞骨架、纤毛和纤毛丛、细胞核、核孔复合体、细胞连接(紧密连接、黏着带、桥粒、半桥粒)、中心体等。
- (4) 观察各种细胞生物学活动的超微结构图片:胞吞作用、胞吐作用、有丝分裂等。

【实验讨论及作业】

通过观看电子显微镜原理视频和细胞超微结构图片,掌握各种细胞器和细胞结构的超微结构,并回答以下问题。

- (1) 透射电镜与光学显微镜的不同点有哪些?
- (2) 透射电镜的构造如何?
- (3) 透射电镜镜筒的组成如何?
- (4) 电子显微镜样品制备的步骤是怎样的?

■ 王俊伟 ■

第六节 细胞有丝分裂和减数分裂观察

有丝分裂和减数分裂是细胞重要的生物学活动。在光学显微镜下,可通过对染色体形态和结构的变化对细胞分裂的各个时期进行观察。

【实验目的】

通过标本观察掌握生物体细胞有丝分裂和减数分裂的形态特征。

【实验仪器设备及材料】

- (1) 标本:马蛔虫子宫切片、蝗虫精巢切片、洋葱根有丝分裂片。
- (2) 器材:显微镜、擦镜纸等。
- (3) 试剂:香柏油、二甲苯等。

【实验原理】

(1) 有丝分裂的原理:有丝分裂是真核细胞繁殖的基本形式,它包括一系列复杂的核变化,出现有丝分裂器,以及遗传物质平均分配到两个子细胞的过程。洋葱根增生区是细胞有丝分裂旺盛的区域,可以观察到有丝分裂各个时期的细胞。

(2) 减数分裂的原理:减数分裂是与有性生殖有关的细胞分裂过程,是保证物种染色体数目稳定和使物种适应环境变化而不断进化的重要生物机制,它是在连续进行的两次核分裂中,染色体只在第一次核分裂前复制一次,因此在形成4个子细胞中染色体数目仅为母细胞染色体数目的一半,其中第一次分裂的前期(前期Ⅰ)有同源染色体配对(联会)和片段互换(交叉)现象,比较复杂。减数分裂大多发生在高等动物生殖细胞,因此蝗虫精巢和马蛔虫子宫是观察减数分裂的好材料。马蛔虫体细胞中只有两对(即4条)染色体,可以清楚的观察到减数分裂过程中染色体形态和结构的变化。

【实验内容】

1) 有丝分裂的观察与结果

取洋葱根有丝分裂片标本,先在低倍镜下观察,寻找和观察处于分裂期和有丝分裂不同时期的细胞形