细胞生物学实验指导

生物实验教学中心

主编：高艳斌

2009-06-01

前言

细胞是一切生物(包括人类)最基本的结构和功能单位。生命科学中的各个学科领域，甚至非生命科学的许多学科领域中的学者们，越来越多地投入到对细胞生命现象的研究。细胞是生命的载体，不理解细胞就不理解生命。在现代生命科学教学中，不设置细胞生物学课，所培养出来的学生就称不上是完全的生命科学家。在细胞生物学放学中，实验课不可或缺。实验课的基本任务是，让学生学习细胞生物学基本技术，使他们具有一定的实验操作技能，并培养他们树立独立设计实验的思考观念和进行科研的基本素质。

我们借鉴兄弟院校的经验编写了这本《细胞生物学实验指导》，由于我们主客观条件所限，而且编写时间仓促，肯定会有不少缺点和错误，请提出批评意见，帮助我们不断改进教学。

目 录

实验是规则与操作要求 …… 1

实验一 细胞形态及大小的观测 …… 2

实验二 相差和暗视野显微镜的原理、使用及标本观察 …… 5

实验三 荧光显微镜原理及应用 …… 9

实验四 电镜参观 …… 12

实验五 植物细胞骨架的显示及光镜观察 …… 14

实验六 人淋巴细胞染色体标本制作 …… 15

实验七 人淋巴细胞姐妹染色体区分染色 …… 17

实验八 碱性磷酸酶的显示 …… 19

实验九 叶绿体的制备及其对染料的还原 …… 22

实验十 人体细胞核型图的制作 …… 24

实验十一 线粒体的分离及活性测定 …… 27

实验十二 联会复合体的染色与观察 …… 32

实验十三 细胞融合 …… 33

实验十四 死、活细胞鉴别 …… 39

实验十五 细胞固定染色法 …… 41

实验十六 早熟染色体凝集（PCC）…… 43

实验十七 细胞同步化 …… 46

实验十八 动物染色体分带技术 …… 48

实验十九 线粒体的显示 …… 50

实验二十 植物愈伤组织培养以及再分化 …… 52

实验二十一 肿瘤细胞培养实验步骤 …… 57

实验二十二 细胞器的分离 …… 62

实验二十三 石蜡切片的制作 …… 66

实验室规则与操作要求

为获得较好的实验结果，避免发生差错与意外事故，特制定以下规则与要求，希望实验者能严格遵守。

（一）显微镜的使用及保护

① 显微镜是细胞生物学实验的主要观察工具，使用时必须注意保持外观整洁、防湿、防高温、防药品侵蚀，使用时勿使染液或其它溶液沾污镜头，一旦沾污，及时用擦镜纸蘸上镜头清洗液（无水乙醚：无水乙醇＝7：3）轻轻擦拭干净。

② 带光源的显微镜待电压稳定后，将电源的光亮度调节器调至最小，再打开显微镜的电源，缓慢调节光亮度适当进行量度观察，观察完毕后，则先将光亮度调节器调至最小，然后再关闭显微镜电源开关。

③ 镜头的清洗：实验完毕后，镜头的清洗很重要。用擦镜纸蘸取少量镜头清洗液，先从镜头的中央开始清洗，轻轻旋转擦至镜头的边缘部分，如此重复 2－3 次。

④ 载物台必须保持清洁，必要时亦可用擦镜纸蘸少量清洗液擦试载物台。聚光器上的污物的去除亦可采用类似的方法。

⑤ 使用完毕后，玻片一律取下，套上布袋.放回原处。本桌的显微镜一律不准搬离本实验桌。若需使用者，可到该桌使用，使用后务必保持该显微镜的清洁。

如若发现违章使用情况，必追究使用者责任，本次实验作零分计。

（二）实验时，实验室内，一律不准高声喧哗整洁，保持室内安静，认真操作，仔细做好各项观察与记录。

（三）实验室内的一切仪器、物品必须爱护。节约材料、药品，取用时不要过量。公用物品不得独自占用，用后归还原处。

（四）注意安全。使用有毒物品、强酸、强碱等，应严格按照操作规程。易燃物品远离火源。禁止湿手拿取电源开关或接触电源。如发生触电等事故，及时报告。

（五）取用各种试剂，要用及时盖上瓶盖。按献宝取出所需之药品或溶液后，不得将原液倒回瓶内。滴管、玻棒、吸管不可混用。

（六）实验中如有丢失、损坏仪器设备及用具，及时登记并报告，凡违反操作规程造成不应有的损失者，视其情节轻重，态度好坏，按有关规定处理。

（七）本实验室欢迎各位实验者对每一实验本身提出新的看法与做法，至于能否采用，视具体情况而定。任何人未经老师许可，不得自作主张，改动任何实验步骤与操作方法。

（八）实验完毕后，须摆齐药品，洗净器皿，做好本桌清洁。整个实验室清洁由本班班长安排。离开前要关好门、窗、水、电。

实验一、细胞形态及大小的观测

一、目的：

1. 观测细胞形态及大小，了解细胞的分类
2. 学习显微测量的方法
3. 学习使用油镜

二、测微技术的原理：

显微侧微尺分为物镜测微尺（简称物微尺或台微尺）和目镜测微尺（简称目微尺）。目镜测微尺是一个可以放入目镜内的特制园玻片，玻片中央刻的刻度长 5 或 10mm，将其分成 50 或 100 格（也有刻成十字形的）如下图。物微尺为一载片上贴着一圆形玻片中央带有刻度、长度为 1mm，等分为 100 格，每一格长 0.01mm（图一）。当测量细胞的大小时，不能用物微尺直接测量细胞，而只能使用目微尺。因目微尺测量的是细胞经物镜放大后的像，因而它每格所代表的实际长度随物镜的放大率而变，在测量时需先用物微尺标定，求出某一放大率时目微尺每格所代表的实际长度，然后再用以测量细胞大小。

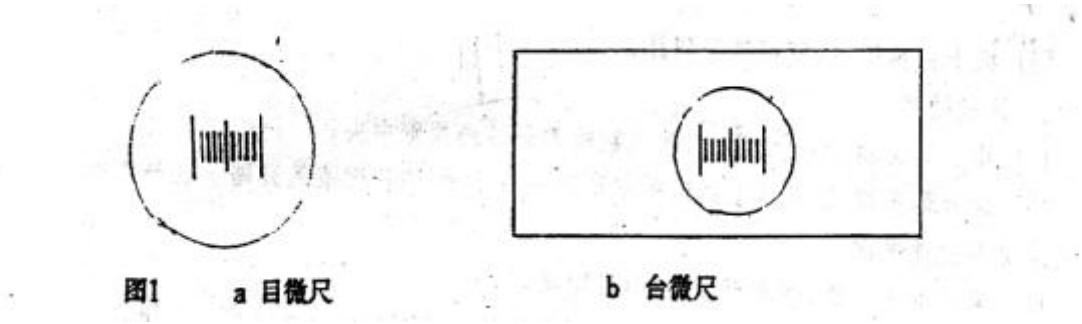


图1　　a 目微尺　　b 台微尺

三、油镜的原理：

油侵系物镜（简称油镜），与干燥系物镜不同，载波片和物镜之间的介质不是空气，而是一层香柏油，其折射率为 1.515 左右。和玻片折射率相近。光线通过载片后，可直接透过香柏油而进入物镜，折射程度轻，这样物镜的镜口率增大，从而提高物镜的分辨率。显微镜的分辨力与物镜的镜口率成反比，与光线的波长成正比；即：

$R=0.61\lambda/2NA=0.61\lambda/2n.\sin\alpha/2$

从上式可知提高介质的折射率可以提高显微镜的分辨能力，如果我们用NA为1.30的物镜，可见光平均波长为 550nm 即黄绿光，则分辨力为 0.2μ。在油镜镜头上一般标有“0i1”，或有一黑色环等做为标志，油镜的放大倍数为 90 或 100 倍。

四、实验用品：

显微镜、测微尺、动物及植物的组织切片、香柏油、檫镜纸、二甲苯。

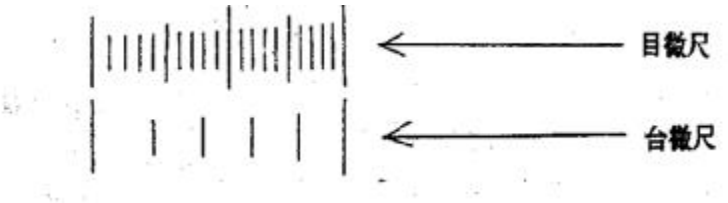
五、实验操作

1、 目微尺的标定

（1）卸下目镜的上透镜（如为 Olympus 显微镜，则卸下目镜下方的金属环），将目

微尺刻度向下装在目镜的焦平面上，再旋上上透镜（金属环）。将目镜插入镜筒。

（2）将物微尺刻度向上放在镜台上夹好，以低倍镜调焦能看到物微尺的刻度，换上你用来测量细胞的物镜（本实验用油镜）。调焦至看清刻度，这时镜中同时看清两尺。小心移动物微尺和转动目镜，使两尺平行，起点线重合，如下图：



然后找出另一处两尺刻度重合处，记录起点线到重合线之间各尺的刻度数（格数），按下式计算。在该放大系统下目微尺每格所代表的实际长度：

目微尺每格所代表的实际长度（μ）=台微尺格数/目微尺格数*10（μ）

（3） 换上待测标本，既可进行测量。

2、油镜的使用：

（1） 用低倍物镜，调焦观察，将待观察的部分移到视野中央。

（2） 旋开低倍镜，在玻片上的观察部位滴一滴镜油，将油镜旋入光路，这时油镜透镜应全部被油侵没。

（3） 调节细调螺旋，使视野清楚，即可观察

（4） 油镜的擦拭：在油镜使用结束后，用镜纸轻轻擦去镜头上的油，再用干净擦镜纸蘸上少许乙醚：无水乙醇（7：3）混合液擦去镜上残余的镜油，最后用干擦镜纸擦干，擦永久玻片或物微尺，方法类似。

3、观察及测量

（1） 多角形细胞：观察小白鼠肝细胞，细胞呈多角形，分界不太明显，以苏木精-伊红染色，细胞质染成红色，细胞核染成兰色，测量其细胞及细胞核的长短径。

（2） 柱状细胞：观察河蚌外套膜两侧表皮细胞，细胞是高柱状或低柱状，一苏木精-伊红染色，测量细胞及细胞核的长短径。

（3） 梭形细胞：河蚌外套膜表皮以内，为结缔组织，其中有横肌和纵肌切面，细胞呈梭形，染色方法同上。

（4） 树枝状细胞：观察兔脊髓运动神经元，分布在脊髓灰质中，细胞突起呈树枝状。

（5） 卵园形细胞：观察人血细胞涂片中的红细胞、白细胞。

4、洋葱根尖细胞大小测定及有丝分裂各时期的观察。

（1） 测量洋葱根尖分生区细胞和细胞核的长短径。

（2） 有丝分裂各时期的观察：

1) 前期：（Prophase）主要是染色质转变为染色体的过程，核仁核膜消失。

2) 中期：（Metephase），染色体分布在赤道面上。

3) 后期：（Anaphase），含姐妹染色单体的染色体的着丝点分离形成两条染色体，分别向两极移动。

4) 末期（Telophase），染色体到达两极后，染色体解螺旋化成染色质，形成两个子核，核仁再次出现，一个细胞分裂成两个细胞。

5、细胞器的观察

⑴ 高尔基体

a， 观察脊神经节细胞；高尔基体银染成棕色，形状为网状或块状，分布在核周围的胞质中。

b， 观察河蚌外套膜表皮细胞；高尔基体染成棕色，呈网状，分布在柱状上皮的远心端（有极性分布）。

⑵ 线粒体

a， 观察兔肝细胞：线粒体呈兰色线、粒状，均匀地分布细胞质中。

b， 观察兔小肠上皮细胞：线粒体呈兰色线、粒状。分布在柱状上皮细胞的细胞质中，分布呈两极状。即主要分布在细胞的顶部和基部。

六、测量结果计算：

1、公式为：

椭球为：$V=4\pi ab^2$（a 为长半径，b 为短半径）

球：$V=4/3\pi R^3$（R 为半径）

2、根据观察与计算结果，填入下表：

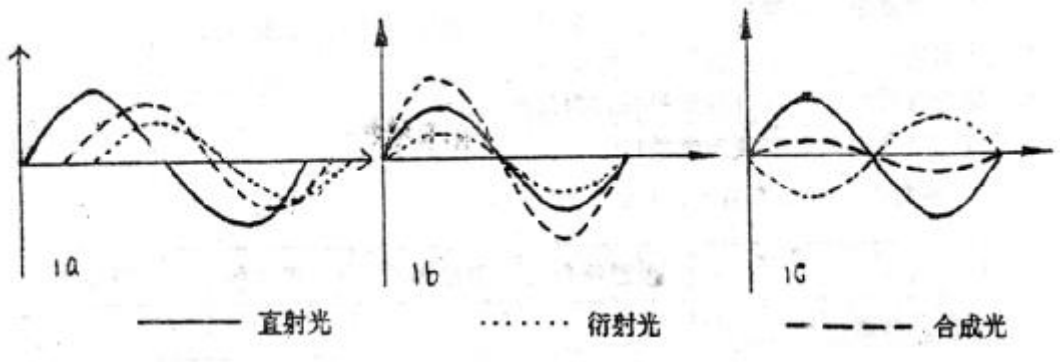
细胞名称	形态特征	细胞体积	核体积	核质比例
小鼠肝细胞				
河蚌外套膜表皮细胞				
河蚌横肌细胞				
人血球细胞				
兔脊髓运动神经原细胞				
洋葱根尖细胞				

3、绘制高尔基体在兔脊神经节细胞，河蚌外套膜表皮细胞中的分布，以及线粒体在兔肝细胞，小肠上皮细胞中才分布草图。

实验二 相差和暗视野显微镜的原理、使用及标本观察

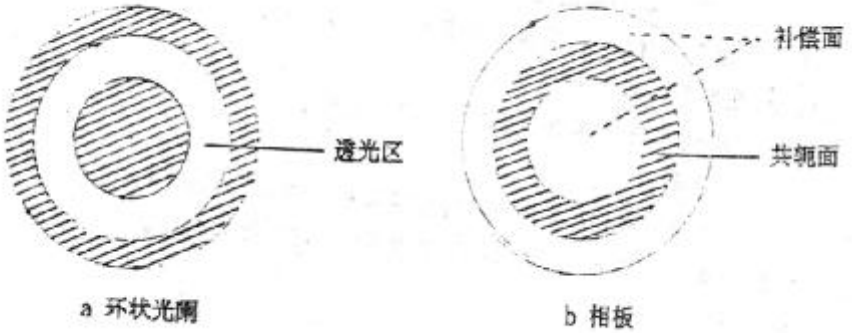
一、相差显微镜：人眼仅能观察到波长（颜色）及振幅（亮度）的差别。活细胞往往是无色透明的，通过活细胞的光线波长及振幅都无明显的改变，因此，在普通显微镜下我们难以观察到活细胞及结构。在实际工作中，许多的工作要求我们观察活细胞，人们设计了适合上述目的的观察工具，相差显微镜就是其中一种。

（一）相差显微镜的原理：当照明光线通过活细胞时，虽然波长及振幅没有明显的变化，但由于细胞的各部分及细胞与周围介质之间折射率有所差别，光线通过各种界面时，一部分直接通过细胞称为直射光。另一部分变为衍射光，衍射光与直射光的波长一致，但衍射光的相位比直射光大约推迟约 1/4 个波长，从标本某一点发出的直射光和衍射光经物镜会聚以后，在物镜的像场交于一点，衍射光与直射光就会发生干涉，而形成合成光波。合成光的波长仍和原来相同，但振幅为两束光的几何叠加。在普通显微镜下，叠加结果没有明显变化，故我们观察不到标本及其细微结构（图 1a）。在相差显微镜中通过改变衍射光或直射光的相位，将直射光和衍射光的相位差变成振幅差。于是就可以在相位显微镜中观察到标本各部分的差别了。改变相位有相板来完成。如果推迟直射光的相位 1/4λ，则直射光和衍射光的相位相同，发生相长干涉，合成干涉比直射光明亮，称负反差（如图 1b）。如果推迟衍射光的相位 1/4λ，则直射光比衍射光超前 1/2λ，这时发生相消干涉，合成光比直射光暗，称正反差。（如图 1c）。



（二）相差显微镜的装置

相差显微镜的主要装置有两个：环状光阑和相板。环状光阑是装在聚光镜中的环状通光孔（图 2a），随着物镜倍数的改变，要改变其大小。通常将 10×、20×、40×、100×（或 90×）四种配合物镜的环状光阑安装在一个软盘内，与聚光器一起组成转盘聚光器。在转盘前还有一个标示孔，转动转盘时，，0、10、20、40、100（或 90）依次进入标示孔，这表示与赶倍物镜相配合的环状光阑置入光路，“0”表示明视野，这时与普通显微镜是一样的，转盘上有供合轴调整用的调节钮，有的是固定在其上的，有的是分开的。



相板（图 2b）是安装在物镜后焦面上的，带相板的物镜称相差物镜，以 ph 标记，相板可以氛围两个部分：一为共轭面，为环状，通过环状光阑的直射光经物镜会聚后，正好落在共轭面上；另外一部分为补偿面，大量衍射光透过这一区域，相板上镶有相位膜，通常为金属电解质 MgO，它能推迟光线的相位（常为 1/4λ），如涂在共轭面上，则推迟直射光的相位，形成明反差。如涂在补偿面，则推迟衍射相位，形成暗反差（正反差），即标本比周围介质暗，在相板上还覆盖有吸收膜，吸收掉一部分的光线，多数是镶在共轭面上，以吸收一部分直射光使其振幅与衍射光相近，这样合成光与直射光反差　才明显。

镜检时，为使效果达到最佳，要求环状光阑的像正落在共轭面上，两者大小也正好相符，这样才能使应被吸收的光被吸收。为了检查是否达到上述要求，拨出物镜就可以看到环状光阑像和相板相反，但因其太小，需用合轴调整望远镜加以放大，有的相差显微镜不是使用合轴望远镜，而用补偿透镜加在目镜中。

为了使光线的相干性好，最好使用单色光照明，常用绿色滤色镜。

获得绿光，还兼有吸热作用，由于相差显微镜的环状光阑通光孔较小，故需较强的照明光源，一般均用人工光源。

下面以 Olympus 显微镜为例，讲述相差显微镜的使用。

（三）调节及操作过程：

1.　光路调中：光路中心和照明光束的中心无比合一，聚光器调中的步骤为：

[1].把聚光器调到最高位置。

[2].开启光源。

[3].转动转盘，使“0”进入标示孔。

[4].将被检样品放在载物台上，用低倍镜聚焦。

[5].缩小视野光阑，在显微镜的视野再可见视场光阑的模糊图象。

[6].微降聚光器使视场光阑的像清晰。

[7].双手调节聚光器的两个调中螺杆，使视场中心移至视野中央。

[8].开放视场光阑，使其周边与视野周边相接，形成视野的内接多边形，如不能内接，则重复 7、8 的操作。

[9].使聚光器升至顶点，光路调中即告完成。

2. 合轴调整：

在设计上，相差显微镜的共轭面的直径和宽度与环状光阑与相板共轭面的透光环一致，使用时，每一相差物镜必与环状光阑相匹配，还要调节两环，使其合轴。

调节方法如下：

[1].从目镜筒中拔出目镜。

[2].插入合轴调整望远镜，转动望远镜上面的螺旋，使其升降（不要从目镜筒中拔出望远镜），至两环清晰为止。

[3].双手轻按环状光阑调中螺杆（有的是临时时插入），并转动，使环状光阑移到环状光阑与相板共轭面完全重合为止，对于 Olympus，调节好一种物镜，其余则全业合轴。

[4] .如果环状光阑的大小与相板的大小不全一致，升降聚光器，使之一致。

[5].拔出望远镜，换入目镜即可开始做镜检观察，环状光阑也应做相应转换。

（四）器材： 试剂和材料

显微镜、镊子、载片、盖片、擦镜纸、二甲苯、紫鸭草花。

（五）利用相差显微镜观察标本：

[1].紫鸭 草花丝绒毛细胞的原生质环流

用镊子小心从基部摘取一先活紫鸭草花丝，置于载片上，滴一滴生理盐水，加盖玻片，相差显微镜下观察。花丝绒毛为发、多个细胞组成的念珠状结构，每个为细胞椭圆形，可见细胞中有管网状结构，管网中有许多颗粒在不听的运动，管网本身也有不断变化。

[2].观察未染色的染色体制片标本

染色体标本是利用哺乳动物的外周血培养，空气干燥法制片获得，观察中染色体和淋巴母细胞核。

二、暗视野显微镜

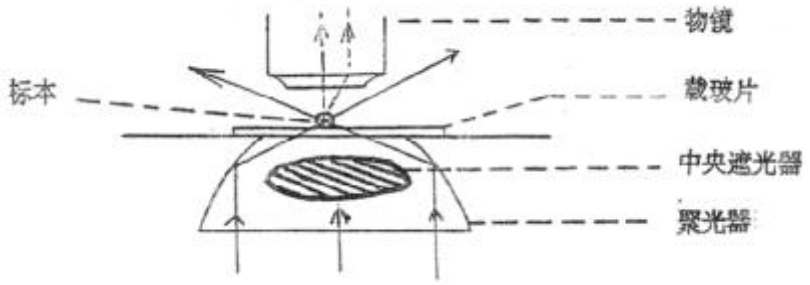
暗视野显微镜，由于能观察到普通光镜下观察不到的微粒，所以又称超显微镜，暗视野显微镜还可以用来观察活细胞线粒体的运动，也可以观察介质中的微生物等。

（一） 原理及结构特点：

暗视野显微镜的设计原理是以 Tyndal 效应为基础的，光线通过胶体介质时，介质会对光发生强烈的散射，如房间中的细小尘埃本不能被看见，但当一束强光照进房间时，我们从照明光束的侧面观察时，就可以看见尘埃。暗视野显微镜应用了特殊的聚光器，不让照

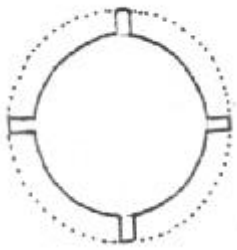
明灯光直接进入物镜造成视野。而是让照明灯光倾斜的照在标本上。标本对光线发生反射或散射，反射光和散射光进入物镜，而观察到标本的状况。

暗视野显微镜和普通光学显微镜相比，在于它所使用的聚光器是暗视野聚光器， 聚光器的中央照明光束完全被挡住，形成暗视野，如图：



由于暗视野显微镜的照明方法主要是利用被物体表面散射光来观察物体，所以能看见物体的存在和运动，不能辨清物体的内部结构。如果被检测物质为透明的非均质，并且直径大于 1/2λ时，各级衍射光进入物镜，就可以观察到物体的结构。

普通显微镜在明视野照明观察物体时，分辨力只有 0.2μm，但是在暗视野照明条件下，可以分辨 0.004μm 的粒子。就是说暗视野显微镜可以观察到在普通光学显微镜下观察不到的 0.2-0.004μm 的粒子。



（二）、操作：简易暗视野聚光器的安装：

1、取下聚光器，并将聚光器的上、下透镜旋开。

2、按聚光器下透镜的上表面直径ϕ剪下一黑纸，并一将边缘 1/5 剪去，剪成如图所示的形状。

3、将剪好的黑纸置于聚光器下透镜的上表面，将两透镜重新旋好，装上显微镜，简易暗视野显微镜就做好了。

（三）、材料观察：

1、 用吸管吸一滴糖水滴于载玻片上，加盖盖玻片，如水太多，用滤纸吸干。

2、 将聚光器上滴加镜油，然后降下聚光器，将玻片标本置于载物台上，把聚光器升起，让聚光器和载片之间浸满镜油。

3、 仔细调焦，观察原生动物如草履虫、棘尾虫等的形态特征。

（四）、注意事项：

1、 聚光器透镜和载玻片之间必须浸油，否则，照明光线；在聚光器上表面发生全反射，不能得到照明，而看不清物体。

2、 照明光线要强，因此应用显微镜灯而不用自然光。

3、 为防止照明进入物镜，可适当调节聚光器上下的位置。

4、 暗视野照明时，注意物镜一定不能高于 0.85，否则会应因镜口率太大而达不到暗视野照明效果。

5、 载玻片不能太厚，以 0.1mm 左右为益，且无裂痕而清洁。

6、 虹彩光阑必须开到最大。

三、实验报告的主要要求：

1、 简述相差显微镜的主要用途。

2、 在使用暗视野显微镜时，反复调焦都不能看见被检物，有什么可能的原因。

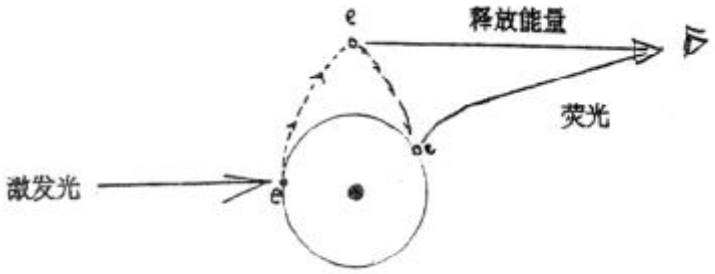
3、 绘制紫鸭草花丝绒毛细胞原生质环流草图。

4、 绘制暗视野显微镜下的原生动物图。（两中以上）

实验三　荧光显微镜原理及应用

一、　实验原理：1852 年 Stokens 发现当以短波光照射某些物质时，这些物质就会发出较长的光波，称之为荧光。

当某一物质的外层电子接收到能量相当时的光量子后，这个电子就会从能级较低的电子层跃迁到能级较高的电子层（激发态），但激发态是不稳定的，大约经过 10^{-8} 秒，电子就会以辐射光量子的形式释放能量而回到原来的稳定状态，辐射的光量子就是光（如图），因为能量还有一部分是以热能的形式散发的，所以荧光光波比激发的光波长。



动物细胞内的大部分成分经激发光波激发后，可以发出淡蓝色的荧光，植物叶绿素等经激发光照射后发出血红色荧光。这种现象称为自发式荧光，或直接荧光。有些细胞成分与发荧光的有机物——荧光染料结合后，而具有发荧光发能力，这种荧光成为间接荧光或次生荧光。

除少数物质具有较强的自发荧光外，大多数细胞的自发荧光否很弱，不能满足实际工作的要求，现在比较广泛利用的是间接荧光，获得间接荧光的方法有两种：

[1].荧光染色法：利用荧光染料使细胞或组织着色，它和细胞内不同成分结合后可发

出一定波长的荧光。

对于不同的组织或细胞组分，目前已成立了一些有效的荧光染色方法，如显示粘蛋白成分的荧光 RAS 反应显示类脂质磷化氢 3R 荧光染色法，显示染色体分带的 Q 带技术等，可选用不同的方法研究不同的细胞成分。

[2].免疫荧光技术：又叫荧光抗体方法，它是利用抗体的特异结合现象。将抗体标记上荧光色素成为荧光抗体。以确定细胞或组织内的相应抗原或抗体的存在及分布上，由于该法是免疫学技术和荧光染色技术结合起来的一种方法，它具有免疫学的特异性和荧光方法的敏感性，作为一种研究方法或实验手段，已经得到了广泛的应用，列如显示膜的流动性的方法，显示细胞骨架的方法等。

二、荧光显微镜：

荧光显微镜，根据其光路不同，可以分为两种类型：

透射式荧光显微镜和落射式荧光显微镜。

透射式荧光显微镜是比较旧式的显微镜。它是由激发光穿过聚光透镜和标本来激发荧光，优点是低倍荧光强，价格低廉，使用方便，对大材料较好，缺点是放大倍数增大时荧光减弱。

落射式荧光显微镜让激发光照射在待测材料上，也叫表面荧光显微镜，是近年来研究发展起来的一种新式显微镜，优点是放大倍数越大荧光越强，益于高倍研究。常用的有日本的 Olympus、Nikon 以及西德的 Opton 及 Leitz 等荧光显微镜。

荧光显微镜的光源一般为超高压汞灯，少数用疝灯或高色温溴、钨灯，前两者可获得叫强的紫外线，后者产生紫蓝光。但真正有用的激发光主要经过滤片滤过获得。这些激发滤片有各种型号，每种型号允许一定波长的光通过。本实验中采用的是 QB24，其透过波长为 3500-4800A，高峰为 4200A 左右。

荧光显微镜中还安有吸收滤片，以获得清楚的荧光映象及保护观察者的眼睛。阻断滤片要选择与激发滤片乡匹配的，如本实验就使用 CB3 。

三、荧光色素：

荧光色素可用做染料，当它与动物或植物细胞内某些成分结合后，发生一定波长的荧光。

荧光对光的吸收有高度的选择性，其荧光发散也有一定的范围，如吖啶橙的吸收峰在 405nm,发散波长在 530-630nm，最高峰在 565nm，如果获得比较强的荧光，需选用与之匹配的滤片系统。

荧光色素的荧光强弱与色素的分子结构有密切的关系，直接受环境条件的影响，所以了解荧光色素的各种性质，选用适当材料，以获得良好的观察效果。

不同的染料有不同的适用范围，如吖啶橙适用于染核酸，荧光增白剂用于染植物的细

胞壁。

pH 的改变将会明显改变荧光色素的光谱，并且明显影响荧光色素的吸光能力和荧光效率，每一种荧光色素均有其最适 pH 值。另外过碱过酸都可能引起色素的破坏。

荧光色素液的浓度对染色影响也很大，绝大多数荧光染料在固体状态下不发生荧光或荧光很弱，只有在溶液中才能显现荧光，当浓度极稀时，浓度增加，荧光增加，但到达某一极限后，继续提高浓度，荧光反而下降。这是因为浓度过大时，色素分子之间缔合，缔合分子会熄灭荧光。

吖啶橙的浓度在 0.5-0.001%时染色活细胞为绿色，死细胞为红色，超出该范围便失去红-绿效应。

在 20°C 时即开始荧光的温度猝灭作用，温度高作用越强，故应在适当温度下染色。

许多物质对荧光也有猝灭作用，如卤酸盐，以碘盐为最强，具氧化作用的物质如硝基苯等，铁、银离子等也具有猝灭作用。

如果激发光过强，荧光会很快褪色，这是因为过强时光能将会超过荧光物质的结合键的结合力，使键断裂而不发出荧光。

四、器材及试剂：

显微镜、荧光光源、激发滤片、吸收滤片、染缸、镊子、载片、盖片、刀片、吸管等。

外周血、新鲜叶片、染色体标本。

酒精 100%、80%、50%、PBSpH6.8 （1/15M）、吖啶橙染液。

五、调光源：

1. 打开灯源将变阻器由小调大，预热几分钟，方能达到最亮。
2. 调节灯源的激光透镜调节环，使光线平行的投射到反光镜上（用平面镜反光），并调整反光镜的方向使视野达到最佳亮度效果。
3. 用低倍镜观察待测标本，调节其亮区在视野中央，对焦后即可进行观察。

六、观察：

1. 叶绿素自发荧光，取一叶片，以刀片横切一尽量薄的小片，滴一滴生理盐水观察叶绿素为红色荧光。
2. 活细胞染色，取一小滴血液于载玻片上，滴一滴吖啶橙生理盐水溶液染色 5 分钟，盖上盖得观察结果：淋巴细胞核为绿色，胞质为淡红色，核仁为桔红色，颗粒细胞核为黄-黄绿色，颗粒为桔红色，死细胞为红色，红细胞无荧光。
3. 固定标本染色：到一染色体制片在 100%、80%、50%乙醇中依次 2 分钟，在 0.01%吖啶橙-PBS 中 1 分钟，以 PBS 封片观察，核及染色体为绿色荧光，质为红色荧光。

七、实验报告：

1. 如何才能得到较好的观察效果？
2. 绘制血细胞荧光染色草图标明细胞种类以及染色结果。

附：磷酸缓冲液（PBS）的配方：

Ph6.8	1/15M	
NaHPO4.2H2O	5.92g	
(或 Na2HPO4. 12H2O)	11.8g	
KH2PO4		4.6g
加蒸馏水至	1000mL	

实验四　　电镜参观

一、实验目的：

了解电子显微镜的工作原理，判断和识别电镜下的各种细胞结构。

二、实验原理：电子显微镜是根据电子光学原理，用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜，使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。

电子显微镜的分辨能力以它所能分辨的相邻两点的最小间距来表示。20 世纪 70 年代，透射式电子显微镜的分辨率约为 0.3 纳米(人眼的分辨本领约为 0.1 毫米)。现在电子显微镜最大放大倍率超过 300 万倍，而光学显微镜的最大放大倍率约为 2000 倍，所以通过电子显微镜就能直接观察到某些重金属的原子和晶体中排列整齐的原子点阵。

1931 年，德国的克诺尔和鲁斯卡，用冷阴极放电电子源和三个电子透镜改装了一台高压示波器，并获得了放大十几倍的图象，证实了电子显微镜放大成像的可能性。1932 年，经过鲁斯卡的改进，电子显微镜的分辨能力达到了 50 纳米，约为当时光学显微镜分辨本领的十倍，于是电子显微镜开始受到人们的重视。

到了二十世纪 40 年代，美国的希尔用消像散器补偿电子透镜的旋转不对称性，使电子显微镜的分辨本领有了新的突破，逐步达到了现代水平。在中国，1958 年研制成功透射式电子显微镜，其分辨本领为 3 纳米，1979 年又制成分辨本领为 0.3 纳米的大型电子显微镜。

电子显微镜的分辨本领虽已远胜于光学显微镜，但电子显微镜因需在真空条件下工作，所以很难观察活的生物，而且电子束的照射也会使生物样品受到辐照损伤。其他的问题，如电子枪亮度和电子透镜质量的提高等问题也有待继续研究。

分辨能力是电子显微镜的重要指标，它与透过样品的电子束入射锥角和波长有关。可见光的波长约为 300～700 纳米，而电子束的波长与加速电压有关。当加速电压为 50～100 千伏时，电子束波长约为 0.0053～0.0037 纳米。由于电子束的波长远远小于可见光的波长，所以即使电子束的锥角仅为光学显微镜的 1%，电子显微镜的分辨本领仍远远优于光学显微镜。

电子显微镜由镜筒、真空系统和电源柜三部分组成。镜筒主要有电子枪、电子透镜、样品架、荧光屏和照相机构等部件，这些部件通常是自上而下地装配成一个柱体；真空系统由机械真空泵、扩散泵和真空阀门等构成，并通过抽气管道与镜筒相联接；电源柜由高压发生器、励磁电流稳流器和各种调节控制单元组成。

电子透镜是电子显微镜镜筒中最重要的部件，它用一个对称于镜筒轴线的空间电场或磁场使电子轨迹向轴线弯曲形成聚焦，其作用与玻璃凸透镜使光束聚焦的作用相似，所以称为电子透镜。现代电子显微镜大多采用电磁透镜，由很稳定的直流励磁电流通过带极靴的线圈产生的强磁场使电子聚焦。

电子枪是由钨丝热阴极、栅极和阴极构成的部件。它能发射并形成速度均匀的电子束，所以加速电压的稳定度要求不低于万分之一。

电子显微镜按结构和用途可分为透射式电子显微镜、扫描式电子显微镜、反射式电子显微镜和发射式电子显微镜等。透射式电子显微镜常用于观察那些用普通显微镜所不能分辨的细微物质结构；扫描式电子显微镜主要用于观察固体表面的形貌，也能与 X 射线衍射仪或电子能谱仪相结合，构成电子微探针，用于物质成分分析；发射式电子显微镜用于自发射电子表面的研究。

投射式电子显微镜因电子束穿透样品后，再用电子透镜成像放大而得名。它的光路与光学显微镜相仿。在这种电子显微镜中，图像细节的对比度是由样品的原子对电子束的散射形成的。样品较薄或密度较低的部分，电子束散射较少，这样就有较多的电子通过物镜光栏，参与成像，在图像中显得较亮。反之，样品中较厚或较密的部分，在图像中则显得较暗。如果样品太厚或过密，则像的对比度就会恶化，甚至会因吸收电子束的能量而被损伤或破坏。

透射式电子显微镜镜筒的顶部是电子枪，电子由钨丝热阴极发射出、通过第一，第二两个聚光镜使电子束聚焦。电子束通过样品后由物镜成像于中间镜上，再通过中间镜和投影镜逐级放大，成像于荧光屏或照相干版上。

中间镜主要通过对励磁电流的调节，放大倍数可从几十倍连续地变化到几十万倍；改变中间镜的焦距，即可在同一样品的微小部位上得到电子显微像和电子衍射图像。为了能研究较厚的金属切片样品，法国杜洛斯电子光学实验室研制出加速电压为 3500 千伏的超高压电子显微镜。

扫描式电子显微镜的电子束不穿过样品，仅在样品表面扫描激发出次级电子。放在样品旁的闪烁晶体接收这些次级电子，通过放大后调制显像管的电子束强度，从而改变显像管荧光屏上的亮度。显像管的偏转线圈与样品表面上的电子束保持同步扫描，这样显像管的荧光屏就显示出样品表面的形貌图像，这与工业电视机的工作原理相类似。

扫描式电子显微镜的分辨率主要决定于样品表面上电子束的直径。放大倍数是显像管上扫描幅度与样品上扫描幅度之比，可从几十倍连续地变化到几十万倍。扫描式电子显微镜不需要很薄的样品；图像有很强的立体感；能利用电子束与物质相互作用而产生的次级电子、吸收电子和 X 射线等信息分析物质成分。

扫描式电子显微镜的电子枪和聚光镜与透射式电子显微镜的大致相同，但是为了使电子束更细，在聚光镜下又增加了物镜和消像散器，在物镜内部还装有两组互相垂直的扫描线圈。物镜下面的样品室内装有可以移动、转动和倾斜的样品台。

三、实验用具及用品：

电子显微镜、超薄切片机、细胞的电镜照片，包埋好的组织快及超薄切片。

四、实验内容：

1. 听老师介绍如何制取玻璃刀，做超薄切片，观看老师演示。
2. 听老师介绍透射电子显微镜的工作原理、结构，从荧光屏上观察细胞的超微结构。
3. 听老师介绍扫描电镜下的细胞表面结构。

五、实验报告：

1. 简述如何识别扫描电镜下的细胞结构。
2. 列表显示你所观察到的几种细胞结构的亚显微结构特点（三种以上）

实验五　　植物细胞骨架的显示及光镜观察

一、原理：

细胞内由微丝、微管、中间纤维等交织形成一个十分复杂的立体网络结构。它们对于细胞形状的保持、细胞内物质运输、细胞运动、细胞内各结构相对位置的固定都有重要作用，故而称为细胞骨架。

细胞骨架在通常固定条件下不稳定，如低温、高压、酸处理等。当采用适当的手段，如 M-缓冲液洗涤细胞，可以提高细胞骨架的稳定性，戊二醛在室温下固定能较好的保存细胞骨架的成分，另外，Triton X-100 处理能抽取掉一部分 杂蛋白，可使骨架成分显现的更加清晰。

微丝、微管、中间纤维等都是直径很小的结构。最大的单根微管才 25nm 左右，只能在电镜下才能看见，目前研究细胞骨架的主要方法是应用高压电镜或免疫荧光显微技术，本实验用普通光镜观察到细胞骨架，是因为骨架纤维成束分布，结构经染色以后，有夸大作用。由于细胞经 Triton X-100 提取剩下的主要成分是细胞骨架成分，使得显现等价清晰。

二、药品及器材：

材料：洋葱鳞茎

器材：显微镜、烧杯、吸管、镊子、载片、盖片

试剂： M-缓冲液（配制方法如下）：

咪唑　　2.90g

KCl　　3.70g　　MgCl2　　0.012g

EGTA　　0.38g　　EDTA　　0.042g

巯基乙醇　　0.086ml　　加水到　　1000 ml

6mM 磷酸缓冲液

KH2PO4　　0.74g

Na2HPO4·12H2O　　2.4g

加水到　　1000 ml

1％Triton X-100：以 M-缓冲液配制

3％戊二醛：　25%戊二醛　12 ml　6nm 磷酸缓冲液　88 ml

染料：　考马斯亮蓝　R-250　0.2g　冰醋酸　7 ml

甲醇　46.5 ml　蒸馏水　46.5 ml

三、实验操作：

1．撕取洋葱鳞茎内表皮表皮细胞（约 1cm^2）若干片置于盛有 6mH　pH6.8 磷酸缓冲液中，使其下沉。

2．吸去磷酸缓冲液，加入 1％Triton X-100 处理 20－30 分钟。

3．吸去 Triton X-100，用 M-缓冲液洗三次，每次三分钟。

4．3％戊二醛固定 30－60 分钟。

5．pH6.8 磷酸缓冲液洗三次，每次十分钟。

6．0.2%考马斯亮蓝 R-250 染色 20-30 分钟。

7．用蒸馏水洗 1-2 次，细胞置于载玻片上，加盖玻片，于普通光学显微镜下观察，就可以看到由微丝、微管组成的网络。

四、实验报告：

1．绘制洋葱细胞骨架的草图。

2.简述洋葱细胞骨架在细胞中的分布。

实验六　　人淋巴细胞染色体标本制作

一、实验目的：

学习动物细胞染色体标本的制作方法，认识染色体形态。

二、实验原理：

染色体是细胞遗传的研究对象，分析认识眼行为对于认识遗传物质的传递、复制、畸

变等都有重要的意义。

获得染色体的方法很多，目前对于哺乳动物比较常用的方法是外周血细胞培养法，就是将外周血接种在适当的培养基中进行培育，人类外周血细胞是终未分化细胞，一般没有分裂能力，但经 PHA（植物血球凝集素）或 ConA 等药物刺激后，转变为可分裂的转化细胞，向培养基中加入适量的秋水仙素，可使细胞停留在中期，可以获得大量的分裂细胞。用低渗盐溶液（一般为 0.4%KCl 或 0.075MKCl）处理，使其中的红细胞及分裂相细胞的膜破裂并使转化细胞膨胀，结合离心技术，可将红细胞碎片及分裂相细胞膜和一部分细胞质除去，最后以气干法制片，可获得较好的染色体标本。

三、试剂和器材：

（一）试剂：

1 .培养基 RPMI1640（或 Eagles 液）、胎牛血清、肝素、PHA、青链霉素、5% NaHCO3、2%碘酒、75%酒精、2μg/ml 秋水仙素（或 10μg/ml 秋水仙胺）。

2 . 低渗液： 0 . 4 ％KCl，预温在 37ºC。

3 . 固定液：甲醇、冰醋酸，每次在使用前按 3：1 临时配制。

4 . 染　液：2%Giemsa

（二）器材：

1 .超净工作台　　2 .恒温箱

3 .5ml 移液管　　4.链霉素瓶

5 100 ml 血浆瓶　　6.50 ml 量筒

7 1 ml，2 ml 注射器　　8 .清洁载片（使用前存冰箱中）

9.恒温水浴（37ºC）　　10.水平离心机

11.尖底离心管（10 ml）　　12.天平

13.试管架，定时钟　　14.吸管，橡皮头

15.相差显微镜　　16.酒精灯

（三）实验材料：

人血 或 猪血

四、实验步骤：

1.培养基的制备：

在超净工作台上，用吸管吸取 RPMI1640 液 10 ml，用 1 ml 注射器取肝素 0.3 ml，PHA0.4 ml，青链霉素 0.3 ml（各 10000 单位/ ml），混合均匀后用 0.5%的 NaHCO3，调整 pH 为 7.0-7.2，然后用 5 ml 吸管分装，每小瓶 5 ml，用胶布封口。

2 .每小瓶接种全血 0 . 3 ml 左右，在 37ºC 培养箱中培养 68-72 小时，培养终止前 6-7 小时加 2μg/ml 秋水仙素 2-3 滴，使最终浓度为 0.01-0.022μg/ml。

3 .自培养箱中取出培养小瓶，用吸管将沉于瓶底的细胞冲散均匀，将细胞悬液移进离心管中。

4 .平衡：将离心管置于已配平的天平上，通过加减离心管中细胞悬液来使天平重新配平。

5 .将离心管移入离心机的对称套洞内，盖上离心机套，打开电源，待速度升到 1500rpm 时，离心 8 分钟。

6 .用吸管小心移去上清液，留下细胞沉淀和上清液约 1 ml，加入低渗液 6.5 ml，吸打沉淀，使之混匀，置于 37°C 水浴 10 分钟，同时按甲醇：冰醋酸=3：1 比例配固定液 20ml，盛于三角瓶中。

7 .预固定：加 1ml 新鲜配制的固定液，，打匀细胞，立即以 1000rpg 离心 10 分钟，移去上清夜。

8 .沿管壁缓慢加入 5-6ml 新固定液，用吸管轻轻打匀细胞团块。

9 .20 分钟后，以 1000rpg 离心 5 分钟，去上清夜。

10.重复 8-9 步 2—3 次。

11.移去固定液，视细胞数量多少加入 05-1ml 新鲜固定液，将沉淀打成悬液。

12.在干净、湿、冷的玻片上滴 2—3 滴细胞悬液，在酒精灯下略加烘烤，使其干燥。

13.在相差显微镜下观察有无分裂相，如分裂相多，分散较好时，继续做下列步骤，如不多且分散不好，则停止，如仅是分散不好，可以再固定一次。

14 将玻片放下染色架上，每片加 2ml--3ml ,2%Giemsa 染液，染色 10 分钟，自来水冲去染液（注意不可先倒掉上染液，否则不易冲掉多余染料），空气中干燥。

15.显微镜下观察。

五、实验报告：

1． 绘制人淋巴细胞染色体草图。

2． 描述实验过程中所出现的现象，试解释之。

实验七　人淋巴细胞姐妹染色体区分染色

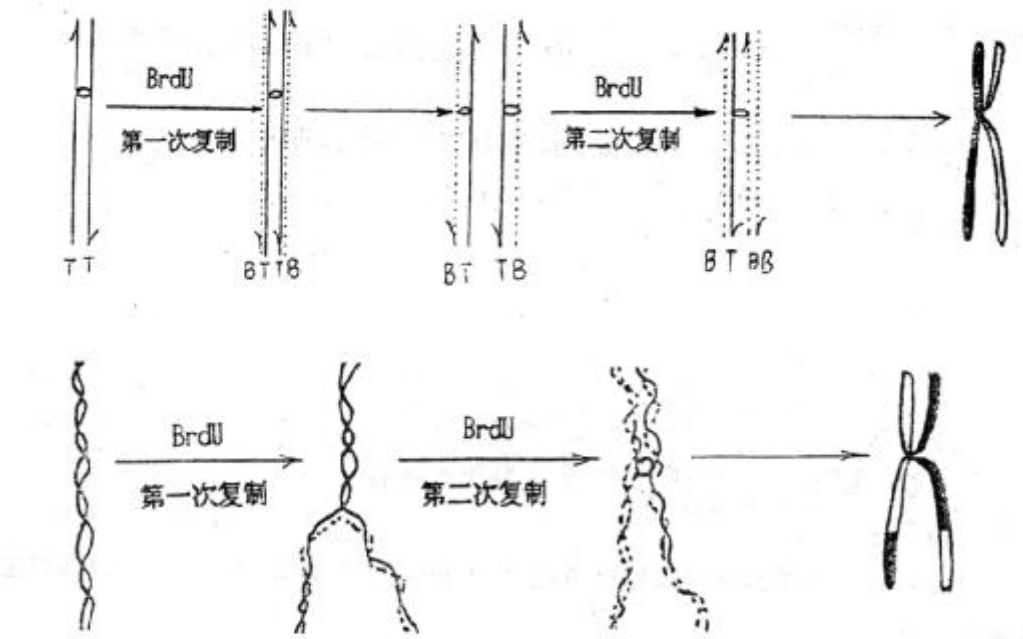
一、试验原理：

姐妹染色体在正常情况下化学组成及结构都是一致的，因此不能用单纯染色方法将之区别开来。

1973 年 Latt 发现让细胞在含 Brdu 的培养基中培养了 2 个细胞周期，再以 Hoechst33258 染色后，两条姐妹染色单体就出现了色差，这就是姐妹染色但提到区分染色（Sister Chromatid Diffeientiation SCD）。

当细胞在含 Brdu 的培养基中复制 DNA 时，Brdu 会当作胸苷的类似物而掺入到 DNA

分子中，经过一个复制期，两条染色单体的 DNA 分子中都有一条是含 Brdu 的新链和不含 Brdu 的老链，称为 BT-染色单体，BT-染色单体再进行一次复制，形成两条 DNA 分子。其中一条 DNA 分子仍属于 BT-型，另外一条则是两条单链都含有 Brdu，到中期时为 BB-染色单体，如图所示：



Hoechst 33258 在对这种染色单体染色时，就发生着色程度的差别。

BB-型和 BT-型染色单体被 Giemsa 染色时，仍然没有光差。因此，先用紫外线照射，使 Brdu 光解，然后以 Giemsa 染色时，则有色差出现，BB-型染色单体染色浅，BT-型染色单体色深。

SCD 可应用于许多方面，如研究 DNA 的半保留复制，细胞增殖动力学，染色单体互换（SCE），SCE 目前很广泛地应用于环境诱变剂的研究。

二、Brdu 溶液的配制：

1.Brdu 溶液：

Brdu	5mg
无菌生理盐水	10ml

溶液装入无菌青霉素瓶，黑色纸避光，置于 4^{o}C 冰箱保存。

2.培养液：PHA，青链霉素的配制与微量全血培养试验相同。

3.0.05%秋水仙素溶液：

秋水仙素	5ml
生理盐水	10ml

4. 2×SSC 溶液:

NaCl	17.4g
枸缘酸钠	8.84g
双蒸水	1000ml

5.磷酸缓冲液：（pH6.8）

6.3%Giemsa 染液（以上述缓冲液配制）

三、器材：

恒温箱（37ºC）	水浴锅（45-50ºC）
紫外线灯（20 或 30W）	铝饭盒
擦镜纸	铁丝架
吸管、镊子	染片玻璃架

四、操作方法：

1.细胞培养与外周血培养试验相同，在加入 Brdu 后，其最终浓度为 10μ/mg 并注意避光培养。

2.用常规方法制备染色体方法。

3.在染色体上（不受片龄限制）滴加较多 2×SSC 溶液，并覆盖上一层擦镜纸，放置在含有 2×SSC 溶液的饭盒内，使溶液恰好浸至玻片表面，放置在水浴锅上的铝板上，使饭盒内溶液温度为 45~50ºC。

4.用 30W 或 20W 紫外线灯，距标本 4~6cm 处照射 30 分钟左右，使标本表面始终保持润湿。

5.用蒸馏水冲去擦镜纸。

6.用 3%Giemsa 染液染色 4~10 分钟，（如果染色较浅，可适当增大 3%Giemsa 的浓度）。

五、试验报告的主要要求：

1.姐妹染色体区分染色技术在理论和实践中有什么意义？

2.绘制姐妹染色单体区分染色草图。

实验八　碱性磷酸酶的显示

一、试验原理：

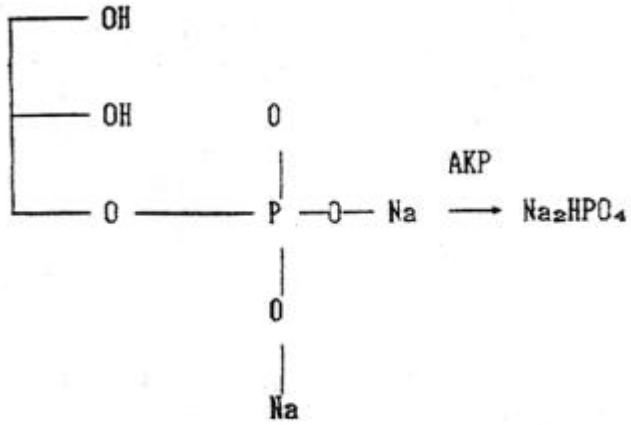
本试验是一个酶组织化学试验，酶组织化学是在不破坏组织细胞的条件下，检测酶的存在，定位与活性的学科，即在酶的存在，分布及其用在显微镜下变成可见的。生命是有序的，

包括时间的有序及其空间的有序。其中美的空间有序性在于其细胞组织结构的精确位置，各种酶的自己的位置保证了化学活动的有效进行。

酶的定位方法必须准确，其显示方法必须具有高度的特异性，使酶本身具有可见性，这是一种直接的方法，目前主要有免疫荧光化学法，该法敏感性高，速度快，但成本高。如果有相同的抗原决定簇时，则会有交叉反应。

方法成熟，使用广泛的还是经典的组织化学方法。下面以碱性磷酸酶的显示方法来学习经典酶组织化学的理论及操作。

经典酶组织化学不是显示酶本身，常采用的方法是：在一定条件下，使细胞中的酶作用于酶的底物，使其产物在原地进行捕捉、沉淀转化为有色产物。碱性磷酸酶（AKP）的显示方法最早由 Gomeri（1939）提出，现在这种方法称为 Gomeri 法。碱性磷酸酶是指磷酸单酯酶Ⅰ，它能在 pH8.6~10.0 的最适条件下分解磷酸单酯，对于与磷酸相接的醇基没有特异性，Gomeri 法是让该酶在碱性条件下，分解甘油磷酸钠，产生磷酸根。



在孵育液中加入 $CaCl_2$，分解产生的磷酸根离子立即被 Ca^{2+}原位捕捉形成沉淀。

$HPO^{2-}+Ca^{2+}\rightarrow\rightarrow CaHPO_4\downarrow$（无色沉淀）

因出现的是无色沉淀，故还不能在光镜下观察到，尚需转化为有色沉淀，先让制片与 $Co(NO_3)_2$ 反应生成磷酸钴：

$CaHPO_4+Co(NO_3)_2\rightarrow\rightarrow CoHPO_4\downarrow$（无色沉淀）$+Ca(NO_3)_2$

再让它与硫化铵反应生成黑色的硫化钴沉淀。

$CoHPO_4+(NH_4)_2S\rightarrow\rightarrow(NH_4)_2HPO_4+CoS\downarrow$（黑色沉淀）

我们可以在显微镜下观察到黑色沉淀的位置，由于以上的这些操作都是在原位进行的，可以认为黑色沉淀的位置就是酶所在的位置，这类方法是让酶作用于底物而将酶显示出来。因此制作酶组织切片的时候不能使酶失活，还要尽量避免酶所需的反应的产物扩散，否则不会得到正确的结果。

二、组织制备：

1.取材：取动物肾、小肠等大块组织，大小约 2-3mm。

2.固定：将取下的材料迅速在冷丙酮中固定 24 小时（一直在 4ºC 中进行），中间换冷丙酮 4 次。

3.包埋：将固定好的材料，用纯酒精脱水 30 分钟（中间交换一次），二甲苯透明（20 分钟），用快速法把材料包埋于石蜡中（用低熔点的石蜡）。

4.切片：切片 5~6μ，在 37ºC 以下的温水中展片，将蜡片粘于涂有蛋白胶的载波片上。

5.把切片置于 37ºC 温箱种干燥小时。

6.将切片置于 4ºC 的冰箱，直至试验前才取出。

三、器材（每小组需用）：

1.立式染缸		12 个
2.镊子		2 把
3.量筒	25ml	1 个
	10ml	1 个
4.恒温水浴（37ºC）		1 个
5.沸水浴		1 个
6.电炉		1 个

四、试剂：

1.二甲苯	2.无水乙醇
3. 95%乙醇	4.90%乙醇
5. 70%乙醇	6.30%乙醇
7. 3% 甘油磷酸钠	8.2%巴比妥液
9. 2% 氯化钙	10.2%硫酸镁
11.2%硫化铵（45ml 蒸馏水+硫化铵 6-7 滴）	12.2%硝酸钴

13.AKP 作用液：

3%甘油磷酸钠	10ml
2%巴比妥液	10ml
2%氯化钙	2 ml
2%硫酸镁	1 ml
蒸馏水	20 ml

五、操作步骤：

1.每人取已粘好烘干的鼠肾切片两块，放入二甲苯（一）→→二甲苯（二）（各 3-4 分钟）的染缸中进行脱蜡，再经 100%乙醇（一）→→100%乙醇（二）→→95%乙醇→→90%乙醇→→70%乙醇→→30%乙醇→→水。每级各一分钟，在移切片时，用镊子夹住切片震荡并提起，放下反复几次，在移入下一染缸边缘前稍停留，让溶液滴净后，再入下

一染缸，以免把上一染缸溶液过多带入下一染缸，而影响切片质量。

2.将其中一块切片以蜡笔作一标记（用作对照组切片），放入沸水中煮沸 5 分钟。

3.将两块切片均放入 AKP 作用液中孵育 30-60 分钟，作用液要事先预热到 37°C，水浴中进行。

4.取出切片在蒸馏水中洗涤。

5.放入硝酸钴溶液 2-3 分钟。

6.蒸馏水冲洗干净，否则切片易被污染，影响定位。

7.切片浸入硫化铵中 2-3 分钟。

8.蒸馏水冲洗干净。

9.经各级酒精脱水。即 30%乙醇→→70%乙醇→→90%乙醇→→950%乙醇→→100%乙醇（二）→→100%乙醇（一），各级一分钟。

六、观察结果：

在显微镜下观察，细胞中有黑色沉淀存在的地方，就表明有酶的存在。煮沸的对照切片无黑色沉淀。

七、实验报告：

1.将自己所作的两张切片交给老师。

2.绘制碱性磷酸酶的分布草图。

3.简述碱性磷酸酶定位的原则。

实验九　　叶绿体的制备及其对染料的还原

一、实验目的：

掌握分离与纯化叶绿体的方法，了解细胞器的一般分离程序及叶绿体的光还原活性。

二、实验原理：

细胞或组织和分离介质混匀，经破碎匀浆后用差速离心法，经几次不同转速可以获得不同的细胞器。离体的完整具有光合活性的叶绿体的制备就是采用这种方法。

被分离的离替叶绿体是否具有光合活性，可以用不同的方法来鉴定，对染料（2-6—二氯酚酊粪）在光下还原作用是其中的一个方法。

$$\text{光}\ e^- \downarrow$$

$$H_2O + \text{氧化型染料（兰色）} \rightarrow\rightarrow O_2 + \text{还原型染料（无色）}$$

所以我们通过染料和离体叶绿体混合液在照明光前后，染料颜色上变化可以鉴别被分

离的叶绿体的活力。

叶绿体是比较大的细胞器，在叶肉细胞中含量丰富，用新鲜的植物叶片匀浆后使用普通离心机进行离心也能得到良好的分离效果。

叶绿体酶系对热敏感，在室温下容易失活，因此，提取叶绿体全部过程必须保持在冷的条件下。这样在实验中所需的基本仪器和药品都必须保存在冰箱中，而且整个操作过程都应在 0-4ºC 条件下完成。

三、仪器设备和材料：

显微镜、镜油、擦镜纸、载玻片、离心机、瓷研体、盘式天平、剪刀、纱布、玻璃漏斗、烧杯、量筒、玻璃棒、滴管、吸水纸、分光光度计、水浴锅、新鲜的菠菜叶。

四 、试剂及配制：

[1].STN 缓冲液：0.4M 蔗糖，0.01M NaCl, 0.005M $MgCl_2$, 0.05M 溶解于三羟甲基胺基甲烷（Tris）—HCl 缓冲液，调 pH 到 7.6。

称取 6.06gTriS，136.9g 蔗糖，0.58gNaCl，0.29g$MgCl_2$ 加入蒸馏水 750ml 混合后用 1N HCl 调节 pH 至 7.6，然后用蒸馏水稀释到 1L。

[2].1×10^{-4} M 3－(3,4-二氯苯)-1，1 二甲基脲（DCMU）。

[3].2.5×10^{-4} M 2.6-二氯苯酊酚,：称取二氯苯酊酚 72mg，溶解于 1L 蒸馏水中，在黑暗条件下保存。

[4].冰块

五、试验程序：

（一）叶绿体的制备。

1、菠菜叶片洗净吸干表面水滴，贮在 4℃冰箱中备用。

2、取 10ml 分离介质（STN 缓冲液）分两次放入研钵中。

3、去掉叶柄和主脉，称取 5 克叶片并把叶片剪称 1－2cm^2 小块和介质一起在钵中研磨，研磨成匀浆为止。

4、将匀浆用二层纱布过滤到烧杯中。

5、滤液用 1000rpm 离心 8 分钟，弃去沉淀，留上清。

6、上清液中加入介质 5ml，混匀，再以 1000rpm 离心 8 分钟，弃去沉淀，留上清。

7、上清液用 2500rpm 离心 10-20 分钟，弃上清液，留下沉淀的叶绿体小球。

8、加入适量冷却的 STN 缓冲液，将沉淀的叶绿体全部悬浮，将叶绿体悬浮液一起贮存于冰箱中。

9、转移出 0.5ml 叶绿体悬浮液到另一只干净试管中，在 60℃水浴中保持 5 分钟，然后取出试管，贴上标签再贮存于冰箱中。

10、分别在两张载片上各滴一滴加热和未加热的叶绿体悬浮液，并用盖片盖起来，在油

镜下观察这两种叶绿体的形态。

（二）叶绿体对染料还原作用。

试管号	染料（2×10^{-4}M）	STN 缓冲液	DCMU（1×10^{-4}M）
1	—	5.0ml	—
2	1.0ml	4.0ml	—
3	1.0ml	3.0ml	1.0ml

1.取出没有加过热的叶绿素悬浮液试管，充分振荡，以便全部叶绿素呈均匀的悬浮状态，然后取 0.1ml 叶绿素悬液，加 4.9mlSTN 缓冲液混合倒入一个干净的比色管内，用这支不含染料的叶绿体比色管作对照， 校正分光光度计零点。

2.象前面那样再次摇匀没加过热的叶绿体悬浮液试管，再取 0.1ml 加到试管 2 中，摇匀后倒入另一支干净得比色管中，放在分光光度计比色管内立即读出吸光率，波长为 600μm。

3.把这个 2 号管的比色杯放入盛水的 100ml 烧杯中，调节比色杯和 60W 光源距离为 10cm，然后打开电源，准确照光 1 分钟，再一次立即读出吸光率。如此反复测定 5-10 次，并以曲线表示。

4.再取 0.1ml 没有加过热的叶绿体悬浮液加入管 3 中，用管 1 校正分光光度计，按步骤 2 到 4，反复这个程序，并记录每次数据，为了减少比色管的误差，可使用同一比色管，每次换溶液时，倒出原来管内溶液，用蒸馏水连续清洗几次，并用吸水纸吸去比色杯内残留的水分，将结果永曲线表示。

六、作业：

1.观察经过加热和未加热这两种叶绿体在形态上的区别，并绘制草图。

2.离体叶绿体对染料的还原作用原理是什么？

3.分离叶绿体是否干净，详细分析原因。

实验十　　人体细胞核型图的制作

一、核型：

一个细胞中的全套染色体按一定方式排一列起来，就叫做核型，单个细胞的这种染色体，能够代表一个个体甚至能代表一个物种的染色体。

有丝分裂中期的染色体结构典型。每一染色体含有两条染色单体，借一个着丝点向两端伸展的是染色体的臂，染色体的长度和着丝粒位置时染色体最重要的形态标志，着丝粒的位置关系到染色体的形状和两臂的长度，在每个物种中，每对染色体上着丝粒的位置不完全一

样，因而把染色体分为四类：

1.中着丝点染色体：着丝粒的位置恰好在染色体纵轴的中央。着丝粒在中部的成等臂染色体。

2.亚中着丝点染色体:着丝粒位置接近中央,亚中部着丝点染色体一般分为短臂和长臂。

3.近端着丝点染色体：着丝粒位置靠近顶端的称为近端部着丝点染色体，长臂较长，短臂较短。

4.端着丝点染色体：着丝点顶端的称端部着丝点染色体，长臂很长，短臂极短。

核型图的制作是把中期染色体标本，染色后（一般用 Giemsa 染色），通过显微摄影放大成照片，再一一剪下，分别按长短、大小、着丝粒的位置等分类排列起来就是核型图。

二、染色体组型模式图：

组型是核型的模式表达,它是通过许多个细胞的全套染色体的测量取平均值绘制而成的模式图，代表一个物种染色体组型的特征，每种动物的染色体组型模式图的绘制至少测量 10 个以上的细胞，然后计算相对长度，臂比指数，着丝点指数，染色体臂数，并计算出标准误差。

1.相对长度:指单个染色体长度与该细胞染色体单倍体的总长度之比,并以百分率表示:

$$\text{相对长度} = \frac{\text{每条染色体长度}}{\text{单倍染色体长度}} \times 100$$

2 臂比指数：指长臂与短臂的长度的比率。

$$\text{臂比指数} = \frac{\text{长臂长度}}{\text{短臂长度}} \times 100$$

按照 Levan（1640）标准划分，臂比指数在 1.0－1.7 之间的为中着丝点染色体，在 1.7－3.0 之间的为亚中着丝点染色体，在 3.0－7.0 之间的为近端着丝点染色体，臂比指数大于 7.0 的染色体为端着丝点染色体 。

3.着丝粒指数：指短臂占整个染色体长度的比率，他决定着丝粒的相对位置。

$$\text{着丝粒指数} = \frac{\text{短臂长度}}{\text{整条染色体的全长}} \times 100$$

按照 Levan（1640）标准划分，着丝粒指数在 50.0－37.5 之间的为中部着丝点染色体，在 37.5－25.0 之间的为亚中部着丝点染色体，在 25.0－12.5 之间的称近端着丝点染色体，指

数在 12.5－0.00 之间的称端部着丝点染色体。

4.染色体臂数：是根据着丝粒位置耐确定的，着丝粒位于染色体端部，称端着丝点染色体，其臂数可计算为一个，若着丝粒位于染色体中部或亚中部的，染色体臂数可计算为两个。

三。人类体细胞核型：

人类细胞正常核型含有 46 条染色体，相互构成 23 对，其中 22 对是男女说共有的，称常染色体，一对为男女所不同的，称性染色体。女性有两条 X 染色体，男性有一条 X 染色体核一条 Y 染色体。

根据丹佛（1960）、伦敦（1963）、和芝加哥（1966）会议提出的标准，即按染色体的长度依次减少和着丝粒的位置，以及其它特征把人体细胞的 23 对染色体分为 7 组：

A 组：包括 1-3 对染色体，中部着丝点、体积最大，易区别，第二对着丝点略偏离中心。

B 组：包括 4-5 对染色体，亚中部着丝点，体积较大，两对不容易区分。

C 组：包括 6-12 对染色体，亚中部着丝点,中等大小，彼此之间不易区分，以下几点有助于识别本组中的各对染色体，6、7、8 号着丝粒靠近中央（短臂较长），9、10、12 号短臂较短，X 染色体大大小介于 6-7 号之间。

女性细胞中有两条 X 染色体，所以共有 C 组染色体 16 条（8 对），男性则只有 1 条 X 染色体，所以 C 组染色体共有 15 条（7 对半）。

D 组：包括 13-15 对，近端着丝点，短臂较短，末端可能有随体，彼此不易区分。

E 组：包括 16-18 对，中等大小，16 号有中部着丝点，长臂上有时又缢痕，17、18 号都有亚中着丝点，后者的短臂较短。

F 组：包括 19-20 对染色体，都有中着丝点，彼此之间不易区分。

G 组：包括 21-23 对染色体，都有近端着丝点，短臂末端可能有随体，长臂常呈二分叉状。

男性细胞的 Y 染色体也属于 G 组，体积略大，短臂末端无随体，链条染色单体长臂常常平行。

四、器材准备：

1.染色体照片。

2.人体细胞染色体组型模式图。

3.硬纸板。

4.剪刀、镊子。

5.直尺、分规。

6.胶水。

五、操作方法：

1.将显微摄影放大后的照片上，一个细胞的全部染色体，一条一条剪下/

2.按上述的分组标准，进行分组，并依次序排列。

3.初步排好后，逐条检查形态特征与分类标准是否符合，确信无疑时，再用胶水粘贴整齐。

六、试验报告的主要内容：

1.人类体细胞的染色体分为几组，每组由那些基本特征？

2.识别染色体的主要标志有哪些？

3.将自己排列的人类体细胞核型图交给老师。

实验十一　　线粒体的分离及活性测定

线粒体是真核细胞的一个重要细胞器，好氧生物细胞需能的25%以上是靠有氧呼吸供给，而线粒体是细胞内唯一有氧呼吸的场所，因此，人们就一细胞“动力站”之称。线粒体结构和功能上的研究至今一直是一个非常活跃的领域，本试验在于学会分离线粒体和测定线粒体活力，以高活力的线粒体制剂用于各种目的的研究。

一、仪器与设备：

1.冰冻高速离心机，或万转/分离心机。

2.组织捣碎机或匀浆器。

3.冰浴，研钵、漏斗、纱布（尼龙布）、量筒、微量注射器、移液管、试管等。

4.瓦氏呼吸器（氧极普测试系统）。

5.显微镜、冰浴。

6.分光光度计。

二、材料与试剂：

1.绝大多数的动植物材料通常都可以制备线粒体，但最好是生活力强，生长旺盛，幼嫩组织为好，如心肌、肝脏、骨骼肌、黄化幼苗、块根、块茎等。

2.TriS-HCl（0.05M，pH7.2）缓冲液。

3.磷酸缓冲液（0.2M，Ph7.2）。

4.提取洗涤液：在1000ml溶液中含有甘露醇（0.35M）、牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin，BSA，1mg/ml），EDTA（0.001M），TriS-HCl（0.01M，pH7.2）缓冲液。

5.悬浮液（同试剂4，但不加BSA）。

6.反应液：在1000ml溶液中含有甘露醇（0.35M）、蔗糖（0.25M）、KCl（10ml，pH7.2）、EDTA（0.2mM）、$MgCl_2$（5mM）、TriS-HCl（10mM，pH7.2）。

7.反应底物：α—酮戊二酸 0.4M，ADP 0.06M。

三、线粒体的分离：线粒体在离体条件先很容易受各种因素（物理和化学的）作用而失活，特别是膜的完整性极为重要，因为只有完整的线粒体才能进行有氧呼吸。所以在分离操

作中要掌握以下几个要点：

[1].整个过程要保持在低温下（0-4ºC）进行。

[2].要注意分离介质的 pH 值，pH 值应和被采用的材料一致。

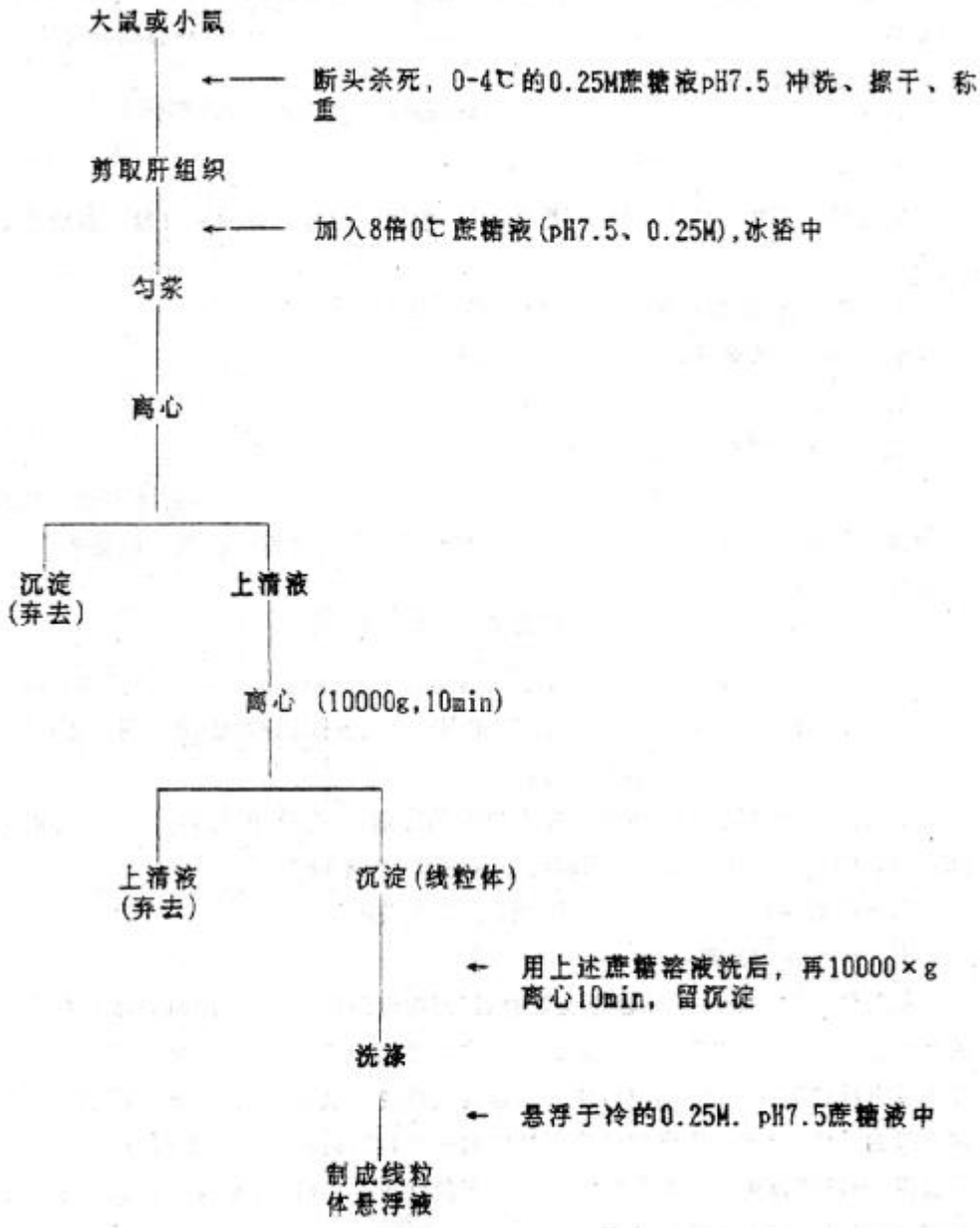
[3].捣碎时间要控制得当，或匀浆适度，争取获得更多的完整线粒体。

[4].尽可能缩短分离时间，争取在 1-1.5 小时操作完毕，以确保被分离线粒体的质量。

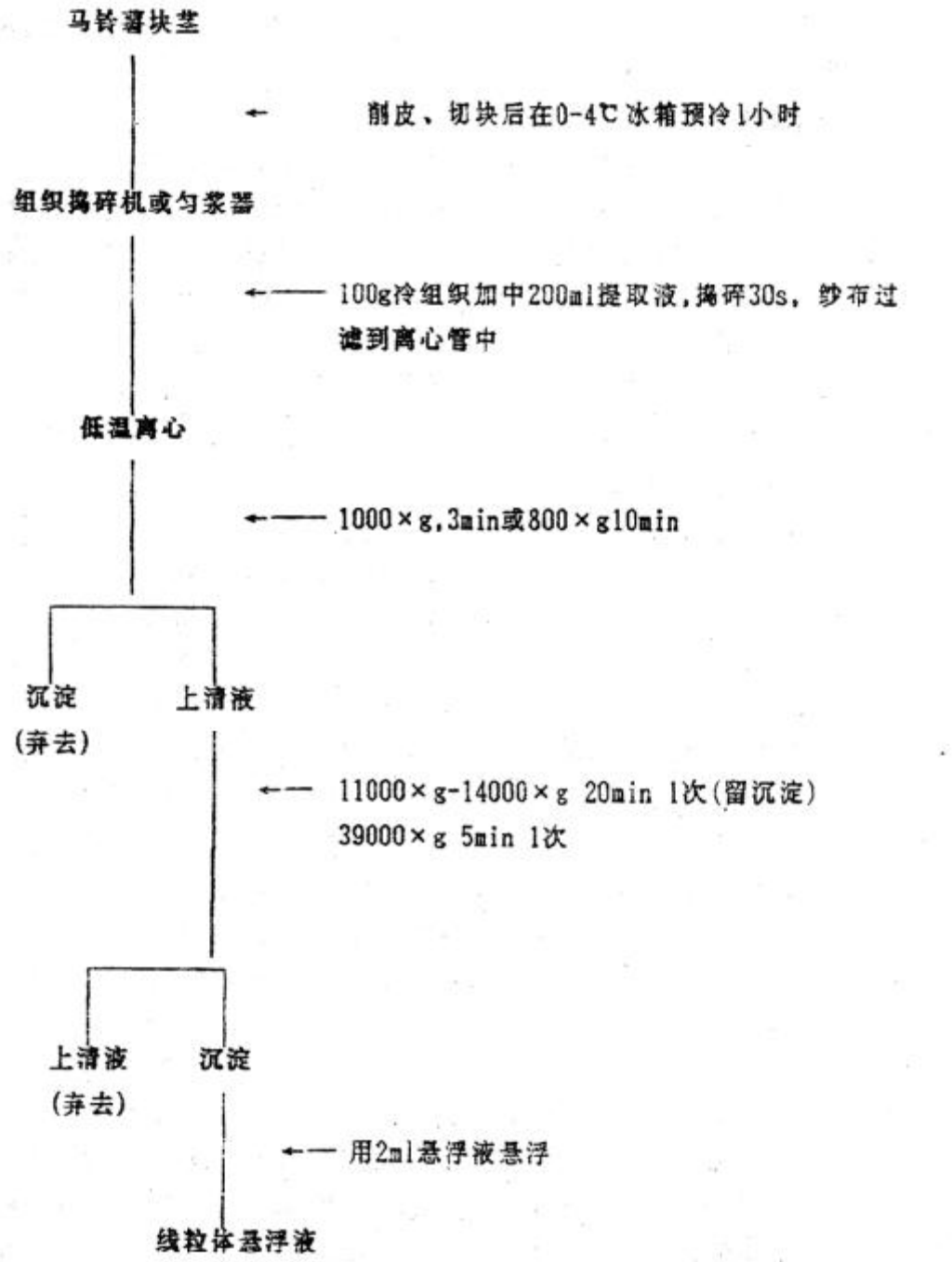
不同材料，在分离线粒体的程序上不同，下面列举兔肝，鼠肝细胞线粒体和马铃薯块茎制备线粒体的分离程序。

1.鼠肝细胞的线粒体分离程序：

将大或小鼠断头处死后，尽可能快地取出肝组织放入预冷的蔗糖分离液中，洗涤，称重，以每克肝组织加 8 倍分离液，匀浆。详细步骤如下图：



2.马铃薯块茎组织线粒体分离



四、线粒体的形态鉴定

1、 活线粒体鉴定：用悬浮液制的 1%janus green B 一滴，线粒体悬浮液 0.5—1 滴在载片上混合，静止染色 20 分钟后，在显微镜下检查，线粒体衩染上兰绿色，破了膜的线粒体不着色。

2、 电镜观察：

把分离线粒体在 4%戊二醛中固定 12 小时，用 0.2M 磷酸盐缓冲液洗 12 小时，再用饿

酸固定一小时，用 0.2M 磷酸缓冲液洗涤 1.5 小时，然后依次以 30％—50％乙醇中各级脱水半小时，在 70 醋酸双氧铀预染 1.5 小时，70％→80％→95％→100 乙醇中脱水各半小时，以上在冰浴中进行，再在温室下 100％乙醇中脱水至干净后，用环氧树脂，Epon812 或 618 包埋，超厚切片后，电镜检查。

3、 线粒体肿胀检查

把分离线粒体在 520nm 下，测定光密度值（OD），肿胀线粒体数量高，OD 值偏低。

五、线粒体活力测定

由于实验目的不同，有其相应指标来鉴别线粒体活性：呼吸控制率（RCR），氧化磷酸化效率和 ^{32}Pi—ATP 交换率可作为鉴定分离线粒体质量指标。

1、 呼吸控制北（RCR）和氧化磷酸化效率（P/O 或 ADP/O）测定。

RCR 是反映线粒体结构的完整性及其功能的一个灵敏指标，RCR 是指加入 ADP 刺激后的呼吸（呼吸态Ⅲ）和 ADP 消耗后的呼吸（呼吸态Ⅳ）之比，即 RCR＝RⅢ/RⅣ，RCR 值的大小，反映了线粒体氧化磷酸化的偶联程度，离体的线粒体在测定呼吸时，不加底物下，也有微弱的耗氧，因此在氧电极记录纸上有较低的斜率直线，这是由线粒体的内源呼吸引起，所以称为呼吸态Ⅰ，当加入外源底物，α—酮戊二酸和β—氨基丁酸后，耗氧率迅速提高，此时下降的斜率称谓呼吸态Ⅱ。当加入 ADP 后呼吸耗氧率进一步升高，此时下降斜率称为呼吸态Ⅲ，当磷酸化底物耗尽后，线粒体耗氧北又降低，此时斜率为呼吸态Ⅳ，所以根据呼吸Ⅰ—Ⅳ改变即可以了解线粒体结构完整性，电子传递及磷酸化偶联状态等。

氧化磷酸化效率是指线粒体利用氧化释放能量转变换为 ATP 的效率，氧化磷酸化效率可用 P/O 或 ADP/O 来表示，P/O 是指在某一氧化底物存在下，消耗一克原子氧时，有多少克原子的无机磷转化为 ATP。ADP/O 指在同样条件下，消耗 1 克原子氧，有多少克分子 ADP 转化为 ATP。按理论计算，α—酮戊二酸和β—氨基丁酸为底物时 P/O 或 ADP/O 值分别为 2.4 和 3，将实测值和理论值相比，可检查出分离线粒体的功能状态。

2、 ^{32}Pi—ATP 交换活性测定

这也是一个鉴别线粒体磷酸化偶联活性指标，交换活性大，线粒体偶联磷酸化活力高。即线粒体质量较好，用未被交换 32Pi 和钼酸铵反应生成钼酸铵，再用分步有机溶剂萃取法提取，被交换的磷形成 ATP 则分配于水相中，然后由水相抽样，用定标器或液闪计数器测量其放射强度，再根据放射强度算出交换活性大小。

六、测定 RCR 和 ADP/O 实例：

不同来源的的线粒体，其反应液系统驻条件下不同，这里以黄化玉米苗线粒体为例。

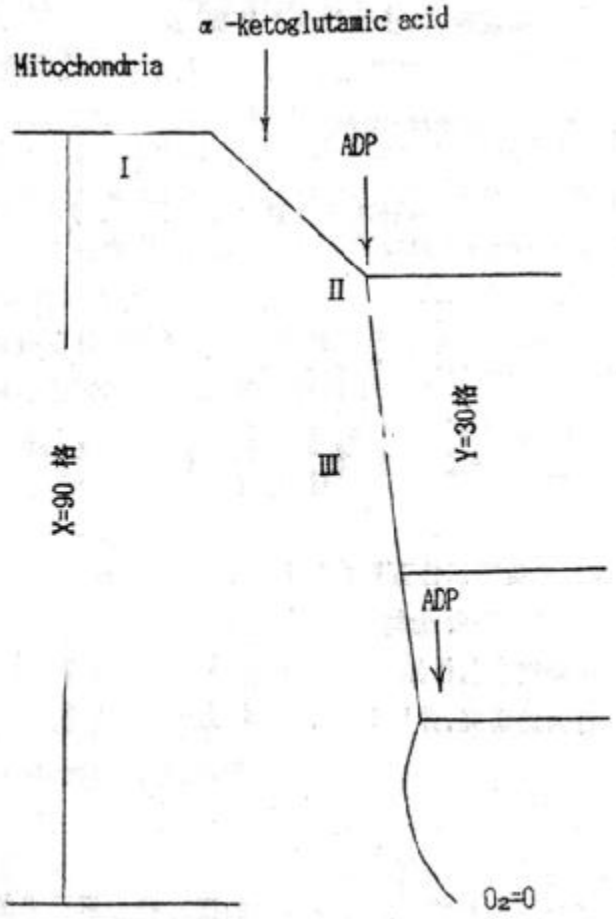
1.反应液用前述反应液，湿度 25℃，氧极谱法。

用注射器将 1.8ml 预保温（25℃）的反应液注入反应室，打开搅拌器，待温度恒定后，开启记录仪并调节灵敏度及零点，加入 0.2ml 线粒体制剂，此时的记录斜率较低直线，为呼

吸态Ⅰ;待斜率稳定后加入 50ul 底物α—酮戊二酸，此时的斜率为呼吸其质存在时氧耗速率，称呼吸态Ⅱ;再加入 1.2uM　ADP，此时出现较大斜率，谓呼吸态Ⅲ; ADP 尽后线粒体耗氧速率自动降低，称呼吸态Ⅳ，如果加 ADP 又回到呼吸态Ⅲ。

反应结果 ADP/O 值计算：

氧化磷酸化结果按图，计算如下：



线粒体控制的氧：

$$\frac{\text{ADP}}{\text{O}} = \frac{\text{加入 ADP 量（uM）}}{\text{所消耗氧量}}$$

所消耗氧量＝U/X×X×V×2

U：每毫升溶液含 UMO_2 量，25℃为 260u mol/L。

V：反应液总体积为 2ml。

X：为 2ml 反应液所含的溶解氧，相当于记录纸上幅度（80）

Y：为 R1Ⅱ格数（30 格）

Z：为由微克分子氧转变为微克原子时系数。

所以耗氧量＝0.26/80×30×30×2×2=0.39

则 ADP/O—1.2/0.39＝3.08（或 P/O＝3.08），RCR＝RⅢ/RⅣ=30 格/14 格＝2.14

1、 注意事项：

（1）制备植物线粒体随组织破碎，伴随线粒体易膨胀，及内源脂肪酸，酚类物物质可抵制线粒体正常活力，所以制备时注意使用甘露醇，蔗糖维持一定渗透压力，加合剂和化合物可降低和去除酚类毒害作用，牛血清白蛋白（BSA）可以抵抗，降低脂肪酸或其它脂类毒害作用。

（2）线粒体活力，也可以用 Warburg 计测定，这样可以同时做几个材料实验。

实验报告：

1、 分析实验过程中所出现每一现象。

2、 写出实验测出的线粒体活力，试分析原因。

实验十二　　联会复合体的染色与观察

1977 年 Moses 证明光镜可以检查联会复合体，其后发展了许多用于明视野显微镜观察的方法，依靠光镜显示联会复合体，不仅对 SC 的构造、功能的研究有用，而且在临床细胞遗传学中对研究染色体异常现象也是有用的，它大大加快了 SC 的研究特别是 X、Y 染色体配对行为的研究，并导致了 X 染色体上一种特殊发夹状结构的表现。

一、实验目的：

1、 观察光镜下联会复合体的形态。

二、实验原理：

联会复合体是指在减数分裂前期，同源染色体的配对行为所形成的一种特殊结构，由侧线、横线和中央轴三部分组成，在前期的粗线期结构较典型，它是动植物同源染色体联会时相当普遍的一种结构。

三、试剂和器材

实验材料：

小白鼠（雄）

器　　材：

离心机、显微镜、水浴（65℃）、培养皿（直径 16cm）、镊子、剪刀、吸管、烧杯、量筒、离心管（10ml）、酒精灯、刻度吸管、镜油、擦镜纸、载玻片、台秤。

试　　剂：

① 0.7％柠檬酸钠溶液。

② 3％中性福尔马林溶液；8.3ml 福尔马林溶液。醋酸钠 1.1 克。加蒸馏水 91.7ml。

③ 50％硝酸银溶液

④ 2.0％明胶；称取 2 克明胶粉末，溶解于 99ml 蒸馏水中，加 1ml 甲酸。

⑤ 甲醇、冰醋酸。

四、实验方法

1、 脱颈处死动物，取出睾丸，放入盛有 1ml 0.7％柠檬酸钠培养器中。

2、 分离并剪碎精小管，用吸管轻轻吹打，使精小管内容物释放出。

3、 移至刻度离心管中，加 4ml 0.7％柠檬酸钠溶液制成细胞悬浮液，室温下低渗 45—60 分钟。

4、 在低渗终止前 10 分钟，加 3％中性福尔马林液 0.15ml，至最终浓度为 0.1％混匀。

5、 常规离心（1000rpm，10 分钟），弃去上清液。

6、 加入甲醇和水醋酸（3：1）混合液（临时用配制）5ml，固定 10 分钟。

7、 以 10000rpm 离心 5 分钟，弃去上清液。

8、 重复 6—7 步一次。

9、 加入 1ml 新鲜固定液，混匀。

10、 吸取细胞悬浮液，滴 2—3 滴于湿冷的载玻片上，置酒精灯上略加烧烤。

11、 银染：加 4 滴 50％$AgNO_3$ 和 2 滴明胶天载玻片细胞面上，混匀，覆以擦镜纸，置酒精灯上烧烤，至玻片标本呈褐黑色为止。

12、 以流水冲，去擦镜纸，晾干。

13、 镜检。

五、实验报告：

1、 做好实验记录。

2、 绘制联会复合体形态草图。

实验十三 细胞融合

一、实验目的：

两个以上的细胞合并成为一个双核或多核细胞称为融合细胞。人工细胞融合开始于五十年代。六十年代到七十年代作为一门新兴的技术发展很快，应用范围极广，不仅名类细胞可以全并，种间远缘细胞也能合并，细胞与组织不同，不排斥异类、异种细胞。动物细胞如此。因此融合细胞的研究成为生物学不论在基础理论上或生产实践上开辟了一条新的道路，如目

前在核质关系，体细胞的遗传与发育，新品种的培养，免疫作用，疾病的治疗和性状的改良。潜伏病毒的研究等方面上，有的已取得了显著的成绩，有的正在探索之中。

通过实验对体细胞融合有一个清楚概念。并初步掌握动物细胞合并技术。

二、材料和方法

（1）取艾氏腹水瘤细胞。用注射器刺入接种瘤细胞 7—10 天的小白鼠腹腔内吸取 1 或 2ml 腹水，注放离心管内；加改良的 Hank’s 液（pH7.4）（缺葡萄糖的 Hank’s 液，Okaba，1962）以 800rpm（转速）离心 5 分钟，取出上清液，再入改良 Hank’s 液，搅拌，再同样清洗两次，一次 5 分钟，一次十分钟，最后再加上适量 Hank’s 液。计算每毫升的细胞数量，如与其它细胞合并用，适宜数目一般为 10^7 个/ml，即毫升约 1000 万个细胞。

（2）取鸡血球，在一只公鸡的翼静脉抽取，抽取数量随需要而定，如取 5 毫升，可用 20 毫升针筒，先将针与筒用 Alsver 液润湿，吸入 50 毫升 Alsver 液刺入翼下静脉，吸取 5 毫升液，注入 15 毫升 Alsver 液瓶内，使血液与 Alsver 液的比例为 1：4。存入 4℃冰箱内务作一星期使用。作实验时取这种贮备的鸡血球 1 毫升加入 4 毫升 0。85%生理盐水以 1200—1500rpm 离心三次（5 分钟、5 分钟、10 分钟），每次离心后去上清液，加 0。85%生理盐水并搅匀，最末一次离心后，根据沉淀血球量的多少，加入适量 0。85%生理盐水使成 1%悬液（0。1 毫升血球加 10 毫升液体），取 1%悬液 1 毫升加上 2 毫升或 3 毫升 0。85%生理盐水或改良 Hank’s 液，使每一毫升含有血球 1500 万左右。

（3）病毒的培养和处理

动物细胞的人工合并可用病毒作为介导物，有很多种类病毒能使细胞合并，如疱疹病毒，牛痘病毒，粘液病毒，新域病毒，副流感病毒，仙台病毒等。其中以新域病毒和仙台病毒为最佳，特别是 Sendai virus,因为在鸡胚中培养容易繁殖，我们就是用 Sendai virus 作细胞合并的介导物。

Sendai virus 是培养在孵化 9—10 天的鸡胚线毛尿囊腔的内胚层细胞中繁殖，作为种子用的病毒和作为细胞合并的病毒，在培养处理上有所不同，因后者用作实验，

所以需要量也大。

接种到鸡胚去的病毒，如不冲淡，会产生不完整的病毒颗粒。要得到完整的病毒颗粒，须把病毒冲淡约 10^{-8} 到 10^{-6} 倍注入量为 0。2ml。这是在尿囊液中培养的标准量，为了避免遗传变性，每五次后改用 10^{-8} 到 10^{-9} 量一次，接种后鸡蛋仍孵化在 37℃小时取出，放在-20℃，40 分钟或 4℃过液，使血液凝结。防止取尿囊液时出血，于是把尿囊液吸出，将每只鸡的尿囊液注入一个试管，每管取少许尿囊液，分别培养，检查有无细胞，并测定血凝效价（HAU），选无菌，效价高的，用无水丙酮快速冰结，保藏作为种子，务下次培养用。

吸出尿囊液后，为了消灭病毒感染力，采用紫外光照射。将 2 毫升病毒悬浮液放入 9

厘米培养皿内，置于紫外光下，淘汰与培养皿距离为 30 厘米，10 分钟，每融 2 分钟摇动一次，灯光的强度约为 2000-3000 尔格/厘米/秒。经过这样处理的病毒，其感染力或活动力减少 100^6 倍，但血凝效价和合并细胞能力没有变化（Harris,1976）。

取一份 Ehrich 腹水瘤细胞（10^7/ml）同一份鸡血球悬液 1500 万/ml 混匀。随即加入两份灭活病毒尿囊液。在 4℃冰水中，不时催动 10 分钟，使细胞凝集。然后置放 37-45℃温浴中 15-30 分钟完成融合过程，镜检计数。

三、细胞融合的观察

（1）细胞在 4℃中凝集，细胞的合并在病毒的参与下进行的，每一细胞要有足够数量的病毒颗粒附在细胞腊上，细胞才能集合成堆，请注意当腹水瘤细胞与鸡血球 1：1 混合加 2 份 Sendai virus 病毒，在 4℃冰浴中进行，几分钟内即可见到细胞集成小团如絮状，说明病毒陷入细胞，把细胞粘合在一起，细胞虽然集合，但并不合并。

（2）细胞合并过程

细胞在冰浴内虽然集合，但不融合，融合要在较高温度中进行。一般在 37℃（Okada 1962）进行，而我们的实验从 37℃（山大科技通讯 1974）提升 45℃融合均行，Okada 等认为细胞合并需要钙离子的作用，它们扒想病毒能使细胞膜破，打通它所接触的两个细胞，造成细胞的渠道，合并的速度各种细胞不同。快的在 37℃五分钟即可。

合并细胞过程在形态上的变化如下：

① 病毒在冰浴中的使细胞粘集。

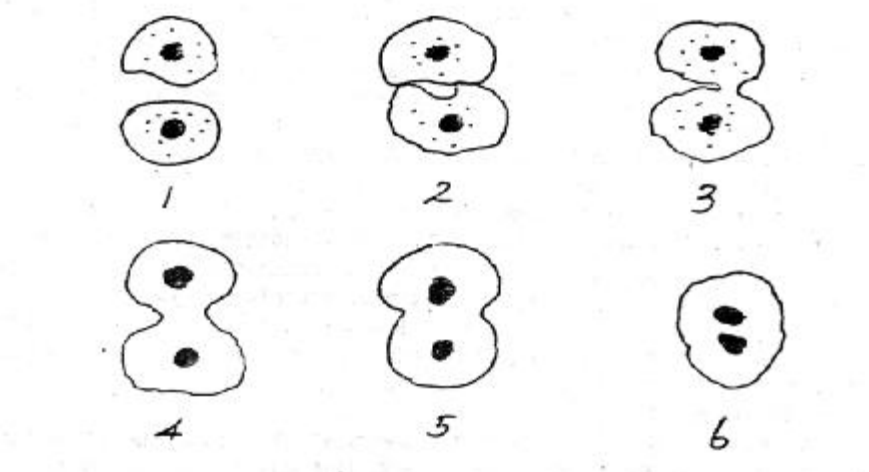
② 在 37℃水浴中的第一分钟，病毒颗粒附近两细胞的膜密切结合在一起。

③ 围在病毒颗粒周围的细胞脱离整体的细胞膜，使两细胞的细胞质经过破口，互相接触。

④ 相接触的两细胞在破口粘合，形成细胞膜通道（37℃约 1-2 分钟以上）。

⑤ 通道扩大，有细胞包围的病毒颗粒流入细胞质（37℃5 分钟）。

⑥ 合并细胞变圆。合并完成。



附录Ⅰ　　溶液配制

1、Hank's 液配制

原液甲：

NaCl	160 g
KCl	6 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g

深于 800ml 重蒸水中

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2 g

溶于 800ml 重蒸水中

$CaCl_2$	28 g

溶于 100ml 重蒸水中

两液混匀后加氯仿	2ml

保存在 4℃的冰箱内。

原液乙：

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$		3.04 g
KH_2PO_4		1.2 g
葡萄糖		20 g

溶于 800ml 重蒸水中

0。4%酚红液		100ml
重蒸水	加至	1000 ml
氯　仿		2 ml

保存在 4℃的冰箱内。

使用时按下列比例配成 Hanks 液：

原液甲	1 份
原液乙	1 份
重蒸水	18 份

以 6×10^4pa（9 磅）10 分钟消毒灭菌，保存于 4℃冰箱中，可用一个月，用前加入 3。5% $NaHCO_3$，每 100ml 加入 1ml $NaHCO_3$ 溶液。

2、0。4%酚酞液制备

0。4 克酚红放在玻离研钵中，逐近加入 0。1mol/L 的 NaOH 并不断研磨。直到所有颗粒完

全溶解。加入的 NaOH 应为 11。28ml，将已溶解的溶液吸入 100ml 量瓶中，用重蒸水洗研钵数次，均集中于量瓶中，最后加重蒸水到 100ml，摇匀后，保存 4℃的箱备用。

3、Alsver 液制备

葡萄糖 2。05 克，枸橼酸钠 0。8g，NaCl 0。42g

重蒸水加至 100ml

附录Ⅱ　　仙台病毒的制备程序

一、灭菌处理

1、实验前 2-3 天将无菌室用福尔马林消毒，实验前一天用 3%的来苏尔喷，灭菌，实验前半小时开紫外灯 30 分钟，孵卵箱在使用前用 70%酒精擦洗两次。

2、将实验服、帽、口罩、纱布、脱脂棉 0。85%生理盐水、无菌纸用高压法灭菌 9。9×10^4pa(15 磅，30 分钟)。

将注射器（10ml、5ml、1ml 各 2 支），镊子（大头各 3 把）、打孔器、离心管（10ml 18 支）、大小试管（各 10 支）、吸管、厂口瓶盖（2 个）、烧杯（500ml、250ml，50ml 各两只）、培养皿（8-10cm）3 个。皆用湿热灭菌或干热灭菌（烤箱内 120℃-150℃烘烤 1 小时）。

二、制备程序

1、将种蛋放入 25℃-30℃温水中浸泡 2-3 分钟，以出后用纱布轻轻擦去水分，晾干后放入 37℃孵卵箱内，每天翻动 4 至 5 次，保持湿度，3 天后开始检查，将未受精的或坏死的取出。

2、孵化 8-9 天时，尿囊腔在内占有较大的位置，此时即可开始接种病毒。接种部位应避开血管，可用铅笔事先作好标记。

3、接常规灭菌法进入无菌室，然后点燃酒精灯，熔蜡，用酒精（70）或来苏尔水擦洗实验台或超净工作台。

4、用灭菌的生理盐水（0。85%NaCl 液）将干病毒冲稀 15 至 20 倍，混匀。

5、将标记好接种的种蛋用瓶盖放稳并用碘酒棉球在注射部位消毒，此时可一个打孔，一个注射仙台病毒 0。2ml。（可用 1ml 的注射器），接种时应注意其注射深度，一般以 0。5cm 为宜，过深或过浅将有可能使病毒注入尿囊内，起不到实验效果。

注射完毕后，再用碘酒棉在针口处消毒并立即用石蜡封口，并标明号数。此步骤要迅速，以免时间过长造成感染或在室温较低时将鸡胚冻死（最好分批做）。

6、将接种好的种蛋立即放入孵箱内，继续培养 48 至 50 小时，取出后放入-20℃冰箱内 3 到 4 小时或负 4℃下过夜。以便血液凝固。

7、打开蛋头（大头），用 10ml 注射器抽取尿囊液。每只取 4-6ml。并标记号数。分别放入大、小试管内（大管做融合用，小管测凝集效价）。

说明：

1、用上述方法制备的第一代病毒含量较低，融合力较小，一般要经过 2-3 次得复壮，其方法同上，即把第一代制备的病毒尿囊液取 0。2ml 再注入孵化 8 至 9 天的鸡胚尿囊中去。

2、打开蛋头。肃去部分蛋壳，用镊子轻轻将鸡胚压下，此时尿囊液上浮，即可用注射器取出，以浅乳白色最好。如变黄，变黑，发臭即为感染，不能使用。

附录Ⅲ　利用聚乙二醇（简称 PEG）为媒介物进行细胞融合

一、溶液配制

①Alsver 液（同前 S）

②0。85 生理盐水液

③GKN 液

NaCl 8g、KCl 0.4g、$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$1.77g，$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.69g，Glucose（葡萄糖）2g，酚红 0。01g 溶于 1000ml 重蒸水中。

④根据实验需要，称取少量 PEG（MW=4000）放入刻度试管或刻度离心管内，在沸水浴或高压蒸汽灭菌 30 分钟，待冷却至 50℃时，加入等体积并预热至 50℃的 GKN 液混匀。

二、融合方法

1. 注射器内先吸入 2mlAlsver 液，再从翼下静脉取鸡血 2ml，注入管内，再加入 Alsver 液 6ml，使成为悬液，混匀后放在 4℃下，可使用 3-4 天。
2. 取以上悬液 1ml0。85%生理盐水，混匀后，以 1200rpm 离心 5 分钟，去上清液后，再以上述条件离心两次（5 分钟，10 分钟）。
3. 将最后一次离心沉淀的血球去上清液，加入适量 GKN 液，使成 10%的悬液。
4. 取上悬液，以血球计数法计数，再以 GKN 液稀释至每立方毫米含红细胞 3-4 万个。
5. 取以上血球悬液 1ml，加入 0。5ml 15%的 PEG 液混匀，在常温下 2-3 分钟后发即可进行镜检，并计算出融合率。

融合率指在显微镜的视野内，已发生融合的细胞其细胞核的总数与此视野内所有细胞（包括已融合细胞）的细胞核总数之比。称为融合率，通常以百分数表示，而且要进行多个视野测定，再加以平均统计，更为准确。

作业

1. 绘制你所观察到的融合细胞。
2. 请你写出细胞融合注意事项。

实验十四　死、活细胞鉴别

实验目的：

1. 掌握鉴定死、活细胞的常用方法及原理。
2. 观察死、活细胞在形态及染色方面的主要差异。

下面介绍两种比较常用的方法

方法（一）　染色排除法

实验原理和方法：

组织培养中检查细胞死活最常用的方法是染色排除法，即以死活细胞对色素的不同吸附能力来鉴别，这种方法简单，适用。但严格地说，它只能判断细胞的代谢死亡，不反应细胞能否增殖。由于未经固定、染色，所以不能看到死、活细胞的形态差别，样品也不能保留。

本实验介绍动物细胞染色排除法常用的染料及染色方法：

第一类死细胞着色：使死细胞着色的大多是酸性染料，它们不容易穿透活细胞的质膜进入细胞内，却能渗进死亡的细胞，使之着色。

1. 台盼兰（Trypan　Blue）：将台盼兰溶于被检测细胞所需的生理盐水中，配成 0。5—1。0%溶液，调 PH7。0—7。2，每毫升细胞悬液约加 0。1 毫升染液，混合后约 2 分钟即可镜检。死细胞被染成兰色。因台盼兰有轻度的毒性，染色时间不宜太长。染色时间 15 分钟以上，活细胞也会因为受损而着色。台盼兰染液不宜久存，陈旧者有毒性。
2. 苯胺黑（Aniline　black）：0。05%苯胺黑 Hanks 溶液以 1：10 量与细胞悬液混合 1-2 分钟后，镜检，死细胞着黑色。此染料毒性很小。
3. 赤显红 B（Erythrosin　B）：细胞先用 Hanks 液或 PBS 溶液洗，以除尽培养基中的或细胞周围的血清，取适量细胞与 0。02%的赤显红 B 混合，两小时之内镜检，死细胞着红色。

第二类：活细胞着色法

0。1%的结晶紫生理盐水溶液与细胞悬液 1：2 混合，立即镜检，活细胞染成兰色。

此外使活细胞着色的染料还有亚甲基兰（Methylene blue）、甲苯胺兰（Toluidine blue）。

方法（二） 吖啶橙法

[一]实验原理：

细胞经甲醇-乙醚固定后，用吖啶橙染色，能鉴别出固定之前细胞的死、活状态。吖啶橙（Acridine Orange，AO）是一种与 DNA 和 RNA 都能结合的荧光染料，在兰光或紫外光激发下，原来的活细胞经固定，染色后细胞呈绿色，核仁和散布在细胞质中的 RNA 呈桔红色，细胞质其余部分为淡红褐色。而死亡的细胞因物质发生变性，其核呈暗绿色，细胞质整个呈这铜色。染色后的标本可存放 14 天以上。此法用于观察药物杀死的细胞的形态特征等。

[二]试剂和器材

试剂：

1. 0。1%的吖啶橙染液：吖啶橙 0。1g，溶于 100ml 蒸馏水中。
2. 磷酸盐缓冲液

   1/15M Na_2HPO_4 700ml + 1/15MKH_2PO_4 300ml
3. 10%缓冲的中性甲醛固定液

   36%甲醛 100ml（加入足量的碳酸镁，强力振荡后放置 24 小时，以中和甲醛中的少量甲酸，取上清液使用）。

   $NaHPO_4$（无水） 7。83g + NaH_2PO_4（无水） 4。21g

   待充分溶解后，加生理盐水至 1000ml。

器材：

清洁玻片，荧光显微镜。

[三]实验步骤

1. 细胞培养在盖玻片上，或细胞涂在清洁的载玻片上，用 Hanks 液轻轻洗两次，再甲醇-乙醚（1：1）固定 10 分钟以上。
2. 下行以无水乙醇、70%、50%、乙醇名 2 分钟，以置换出乙醚，蒸馏水充分冲洗。
3. 滴加吖啶橙染液，室温下，暗处浸染 5 分钟，蒸馏水洗 2 次。
4. 磷酸盐缓冲液（pH7。0—7。2）分色 1-2 分钟。
5. 加一滴甘油-水（1：1）封片，四周用指甲油封固。

结果观察：置荧光显微镜下观察，蓝光激发。活细胞的核呈亮绿色，其中散布着桔红色斑点，是 RNA。核仁因有 RNA 也呈桔红色，细胞形态完整。死细胞的核通常呈暗绿色，胞质亮铜色，内有空泡，呈破渍状。其具体形态随细胞致死的原因而异。例如用不同的药物

处理，死亡细胞的形态便不尽相同。如药物使染色体凝聚，能观察到核区有很亮的染色体凝块。

实验报告：

1. 观察并详细描述死、活细胞的形态差异、染色差异，试解释之。

实验十五　细胞固定染色法

一、实验目的

掌握 H・E 染色法和 Giemsa 染色法的原理及染色特征。

二、实验原理：

细胞固定染色法是用一定的化学物（固定剂）迅速杀死细胞，再进行染色观察。

固定的目的是使细胞内的蛋白质，脂肪，核糖等转变为不溶性物质。从而避免自溶及腐败。经过固定的细胞，在相当大的程度上保持了原有的结构，这样的制版一般能保持很长时间。我数固定剂并具有媒染作用，使细胞容易着色。清楚地显示细微结构。

固定剂不同，其性能也有差异，一种固定剂对某种结构保存效果好，对别的结构不一定适合，染色剂更是对细胞内的各种化学成分有不同的亲和力。所以每种组织通常有其特定的固定染色方法。

本实验介绍两种常用的基本染色法。

①常规苏木精-伊红染色法（HE 法）：

HE 法是组织学技术的基本方法，适用于各种组织，各种包埋方式的切片以及培养的组织、细胞。苏木精是从苏木中提取的天然物质，是染细胞核的优良染料。而苏木精对组织亲和力很小，不能单独使用，需配以氧化剂如高锰酸钾、过氧化氢、碘酸钠。等使其脱氢成为苏木红；或令其在空气中自然氧化，并加入带强正电荷的复盐如：铁明矾、铬矾、钾矾等配成混合液使用。在细胞核染成兰色之后，用伊红复染细胞质。

②Giemsa 染色法：

Giemsa 染料（细胞遗传学家 Gustav　Giemsa 配成此种染料）不是一种单一的染料，而是数种染料的混合物，它们是甲基蓝及其氧化产物——天青（azure）和伊红 Y。其染色的质量随所用染料的比例不同而异。

天青 A 和天青 B 都是噻嗪系列的成员，是甲基蓝和重铬酸钾一起氧化的产物。天青 A 是一种碱性染料，分子式是 $C_{14}H_{14}N_3SCl$，分子量 291。799，它对染色质 DNA 的反应与雪夫试剂（Schiff）一样，实际上是一种醛反应，所以它能使 DNA 和光华着色，着色的染色

体和 DNA 的色泽明亮。

伊红 Y 是一种酸性染料，玫瑰红色，属吨（xanthene）系列。

Giemsa 染色液一般是将上述这些粉剂混合物溶解于甘油和甲醇中；经染色后，染色质呈现红色，而细胞质为蓝色。

三、试剂和器材

方法①：

试剂：

1%$NaHCO_3$ 水溶液、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯、中性树胶、酸化乙醇分色液（含 0。5%浓盐酸的 70 乙醇）。

FAA 固定液：70%乙醇 70ml ＋ 冰醋酸 5ml ＋ 36%甲醛 5ml

Mayer 酸性苏木精明矾染液：

苏木精 0.5g　　铵明矾（NH_4）$_2SO_4Al_2$（SO_4）$_3$ • 24H_2O　0.5g

$NaIO_3$ 0.1g　　甘油 30ml　　冰醋酸 2ml

依次加入 70ml 蒸馏水中溶解后过滤备用。

伊红染液：

伊红 Y 0.5g 加水 100ml

Hanks 盐溶液：

10×母液配制：

NaCl	80.0g	$MgSO_4 • 7H_2O$	2.0g
KCl	4.0g	$Na_2HPO_4 • 12H_2O$	1.2g
KH_2PO_4	0.6g	葡萄糖（无水）	10.0g
*$CaCl_2$	1.4g（先单独用 100ml 三蒸水另溶后合并）		

Hanks 工作液配法：取 100ml 母液+900ml 三蒸水＋1%酚红（单独配置）2ml，10 磅 20 分钟高压消毒，后用消毒的 $NaHNO_3$﹣﹣﹣调 PH 至 7.0－7.2.4℃保存备用。

器材：

体外培养细胞（或各种组织切片）、立式染缸。

方法：

试剂：

甲醇－冰醋酸（3：1），现配现用。

Giemsa 原液：

Giemsa 色素 1g　甘油 66ml　纯甲醇 66ml

将 Giemsa 色素置研钵中用甘油研磨至无颗粒为止，移入 55-60℃水浴内 2 小时，不时摇动使其溶化，待冷后加入甲醇。贮于棕色瓶内。室温下放置 2-3 周后，以粗滤纸过滤备用。

磷酸盐缓冲液（pH6.8）：

1/15M Na_2HPO_4 50ml + 1/15M KH_2PO_4 50ml

器材：

培养人外周血细胞、清洁玻片、吸管、量筒、烧杯、

实验步骤：

方法 1：

本实验以单层培养细胞 HE 染色为例：

1、细胞培养在盖玻片上，取出后用 Hank s 液轻轻洗两遍。

2、入 FFA 液固定 15-30 分钟，蒸馏水漂洗。

3、入 20：1 水稀释的 Hayer 酸性苏木精明矾染液浸染 10 分钟，自来水冲洗。

4、入酸化乙醇至核变紫色。

5、入 1％$NaHCO_3$ 溶液碱化，漂洗至核呈兰紫色，自来水冲洗。

6、入伊红染液浸染 1 分钟，水洗。

7、入 95％乙醇对伊红分色，至胞质桃红色。此时即可做临床镜检。

8、如欲做长期保留的标本，上述细胞样品再入 95％乙醇，无水乙醇各 2 分钟脱水，两次二甲苯透明，每次 5 分钟，滴加中性树胶，封片。

结果：细胞核兰紫色，细胞质桃红色。

方法 2：

1、细胞培养在盖玻片上，取出经 Hank s 液轻轻洗两次，半小时入纯甲醇固定 5 分钟，或者甲醇－冰醋酸（9：1）固定 10 分钟，如果着重显示染色体，则可用甲醇－冰醋酸（3：1）反复固定 10 分钟（具体方法见前面的实验）。充分晾干。

2、将 Giemsa 原液用磷酸缓冲液（1/15M pH6.8）稀释 10－20 倍，、滴在载玻片上，染色 5-15 分钟。

3、流水冲洗，晾干，即可镜检，若需长期保存，则充分干燥后，用甲苯透明，树胶封片。

实验结果：细胞核红紫色，细胞质蓝色。

五、实验报告

1.详细描述所观察到的实验结果，绘出草图，并对所得结果加以解释。

实验十六：早熟染色体凝集（PCC）

一、实验目的：

1.理解并掌握早熟染色体凝集方法。

2.加深对细胞周期各时相染色体凝集与去凝集得理解。

二、实验原理：“

Mazia(0963)提出在细胞周期中存在一个染色体周期，即染色体在 M 期是凝集状态，G1 期向 S 期发展时染色质逐渐去凝集，由 S 期向 G2 期发展时又逐渐凝集。然而染色质在周期细胞中的变化，在显微镜下并观察不到，直到 1970 年，Johnson 和 Rao 在仙台病毒诱导下的 Hela M 期细胞和间期细胞的融合，才第一次显示处于细胞周期的存在。除了灭活的仙台病毒可以诱导细胞融合外，还有灭活的鸡的新城疫病毒也有此作用。由于病毒的制备比较复杂，现多用化学方法如聚乙二醇（PEG）进行细胞融合，比较方便易行。在细胞融合中，M 期细胞诱导间期细胞产生染色质凝集，称之为早熟凝集染色体（亦称为 PC 染色体），此种现象称之为早熟染色体凝集（PCC）。早熟染色体凝集有以下特征：

1. 此种凝集的间期染色质的形态与细胞在融合当时细胞所处的周期时相密切相关，如 G1 期细胞染色质是单线状；S 期呈粉末状，但随 S 期的向前发展，除了有粉末状染色体之处逐渐出现越来越多的成双的凝集染色质结构，因 S 期正在进行 DNA 的复制。正在部分复制的 DNA 高度解螺旋，故在光镜下看不见，只看到未解螺旋或复制后又凝集的染色质，故呈现出程度不一的粉末状。到 G2 期时，染色体已经复制完毕，均为两条并在一起的染色体，边缘光滑，但较中期或早中期染色体长。
2. 无种族的屏障。低等动物和高等动物细胞之间均可融合，并诱导 PCC，如培养 HeLa M 期细胞可以诱导大、小鼠、仓鼠、麂细胞和多种哺乳类细胞发生 PCC 等。也可诱导蚊子细胞以及许多非培养细胞如精子，精细胞甚至植物细胞产生 PCC。
3. M 期细胞与间期细胞的比率大，则易于诱导 PCC，如两个 M 期细胞和一个间期细胞融合则产生 PCC 效率高，速度快。
4. PC 染色体数目相当于被诱导的该种细胞的染色体数目。

20 多年来的研究认为，促进真核细胞分裂的因子为（MPF）（maturation or M-phase promoting factor）。MPF 主要由 cdc2 表达产物 p34 及 cdc13 的产物 p56 又称周期蛋白（cycline）所组成。当 p34 与 p56 结合时 p34 脱磷酸化，产生有活性的蛋白激酶，引起一系列的磷酸化级联反应，诱导有丝分裂的各种生化及形态、功能的出现。目前已知 H1 组蛋白和核仁 B23 蛋白为 p34 激酶的底物。此项研究还在进一步深入。

早熟染色体背信在实践中的应用也很广泛，例如可用于细胞周期的分析，根据一定数量的 PCC 中，各期 PCC 数量的比例可知药物将细胞阴断于细胞的哪一时期。G1 期向 S 期的发展是由凝集完全去凝集，根据凝集程度可分为 G1+1、G1+2、G1+3、G1+4、G1+5、G1+6 六级，G+1——G1+3 为早 G1 期，G1+4——G1+6 为晚 G1 期，正常细胞多阻断于早 G1 期，转化细胞或癌细胞多阻断于晚 G1 期。此种特征可

用于判断细胞是正常细胞还是转化细胞或癌细胞。此外可用于环境中物理或化学因子对靶细胞的间期染色体的损伤。有些不再分裂的细胞的损伤可用 PCC 来判断。白血病人化疗效果及预后检测，遗传学分析，以及制备高分辨的染色体带谱等。

三、试剂和器材：

试剂：

1. RPMI-1640 培养液，小牛血清，0。25%胰蛋白酶液，Hanks 液，秋水仙素（2ug /ml）。
2. 50%PEG 液的配制：称取 PEG 粉末（分子量为 1000 或 600 均可），于 70℃水浴，融成液态，再与预热无血清的 RPMI-1640 培养液等量混合，即得 50%PEG 溶液。
3. 胸腺嘧啶核苷（TdR）：配制成 50mg/ml 溶液。每个培养物 5ml 加 5 滴（5 号针头），使最终浓度为 2mM。
4. 胞嘧啶核苷（CdR）
5. 无菌和其它条件同实验“组织培养”和“细胞融合”。

器材：略

实验材料：

人体肝癌细胞系（BEL-7402）或其它细胞系，细胞株。

四、操作步骤：

（一）细胞培养：

人体肝癌细胞系，单层培养于含有 20%小牛血清的 RPMI-1640 培养液内。细胞形态呈多边形，增长迅速。细胞倍增时间为 20 小时，S 期为 10。5 小时。

（二）细胞同步化处理：

1. 取对数生长期但未形成茂密单层的培养细胞，给与 2mM 的 TdR 作用 22-24 小时
2. 再用 Hank s 氏液洗涤培养细胞后，换入含有 0。01mM 胞嘧啶核苷（CdR）的培养液培养 4 小时。
3. 加入秋水仙素（终浓度为 0。012ug/ml）阻断 14 小时；或在细胞对数生长期时，不经同步化处理，直接加秋水仙素作用 20-24 小时得到 M 期细胞。
4. 用手摇自然脱壁法，收集 M 期细胞，大约能收集到 90%的 M 期细胞：
   - 去掉含秋水仙素的细胞培养液。
   - 加入 5ml Hank s 液，将培养瓶保持水平方向摇动 15-20 次，使生长在瓶壁表面上的已园缩的细胞脱落于 Hank s 液内，离心，涂片，染色，观察。
   - 间期细胞采用 M 期细胞脱壁后的底层（巾壁的少部分细胞）或对数生长的细胞，经胰蛋白酶消化后收集备用。

（三）PCC 的诱发

（1）悬浮融合法

1. M 期细胞和间期细胞（Ⅰ）按 M：I=1：1（或 2：1）比例混合于离心管内，细胞总数为 10^6-10^7 个。
2. 用无血清的 RPMI-1640 培养液洗两次，每次均在 1000rpm 离心，收集细胞。
3. 去上清液，加入 1ml 的 50%的 PEG，用滴管轻轻吹打，使之混匀，37℃静置 1-2 分钟。
4. 随后逐渐加入无血清 RPMI-1640 培养液至 10ml，37℃下继续静置 5 分钟。
5. 用无血清 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次，充分去除 PEG。
6. 去上清液，将细胞悬浮于含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液中 37℃温浴 30 分钟。
7. 收获细胞按常规染色体标本方法制片。

（2）单层融合法

1. 60%-70%生长汇合的单层细胞，用秋水仙素处理（最终浓度为 0。012ug/ml），4—10 小时后，倒去培养液。
2. 细胞面先经无血清的 RPMI-1640 培养液洗涤三次。
3. 吸取 50%的 PEG 溶液铺盖于细胞生长表面，2-5 分钟以后，尽量倒去 PEG 溶液。
4. 用 RPMI-1640 液清洗细胞生长面（2-3 次），去除 PEG。
5. 用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液 37℃温浴 30-60 分钟。
6. 按常规胰酶消化法脱壁收集细胞，进行染色体制片，方法同前。

五、实验报告

1. 绘出你所观察到的每一种早熟凝集染色体，并加以解释。
2. PCC 有何实际意义。

实验十七　细胞同步化

一、实验目的：

1. 理解细胞同步化的基本原理。
2. 掌握同步化实验技术。
3. 加深对细胞周期各时期的理解，进一步掌握细胞培养技术。

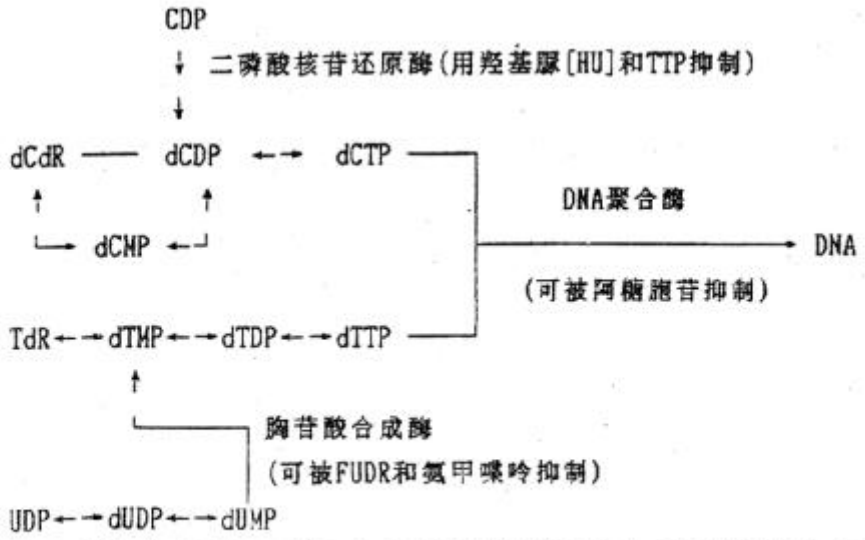
二、实验原理：

细胞同步化是指自然的或经人为选择或诱导造成的细胞周期同步化，前者称自然同步化，后者称人工同步化。而人工同步化又可分为：选择同步化和诱导同步化。

诱导同步化：是指利用药物阻断代谢，把细胞阻断于细胞周期的某一点上，然后将细胞转入正常培养液中使细胞同步化的方法。例如用羟基脲和过量胸腺嘧啶核苷均可将细胞阻断

在 G1/S 交界处，从而获得 S 期细胞的同步化；利用秋水仙素将细胞阻断在分裂中期；培养基中缺乏异亮氨酸则可将细胞阻断于 G1 期。下面介绍阻断细胞于 S 期的 TdR 阻断法。

①TdR 阻断法：在培养的细胞中加入过量的 TdR，则能抑制细胞 DNA 合成。其机制为 2mM　TdR 引起 DNA 合成减慢的原因。因为它反馈抑制二磷酸核苷还原酶活性（见图）。这个抑制 DNA 合成可以被加入脱氧胞嘧啶核苷（dCdR）而解除。因为 dCdR 排除了胞嘧啶核苷二磷酸盐转化为脱氧胞嘧啶核苷二磷酸盐的必要性。



图：用抑制dCTP或TTP形成的方法或用抑制DNA聚合酶的方法阻断DNA合成

二次给予过量的 TdR 法：第一次阻断时间相当于 G2，M 和 G1 期时间的总和这就使得为些部分的细胞都积累在 G1/S 区域。然后通过细胞洗涤而释放，使所有被累积在 G1/S 期细胞以及原先停留在 S 期的细胞都能通过 S 期。然后第二次给予过量的 TdR，则使细胞大部分被积累在 G1/S 处，后按上述方法使抑制释放就能得到较高同步化的 S 期细胞。

②选择同步化；主要是有丝分裂选择法。单层培养细胞处于对数生长期时，细胞分裂活跃，分裂细胞变园，隆起，与培养器的附着性降低，稍加振荡，M 期细胞则脱落而悬浮于培养液中，倾出培养液贮于 4℃冰箱中保存，再加入新鲜培养液 37℃继续培养，30 分钟后，再依上法收集 M 期细胞，反复上述操作，便可获得一定数量的中期细胞，以供研究。此法的优点是细胞不受药物等的伤害。

三、试剂和器材

试剂：RPMI-1640 培养基，Eagle 培养基，小牛血清，PHA，TdR（H_3TdR）,CdR，双抗。

器材：37℃培养箱，培养瓶，吸管，移液管，恒温水浴锅，倒置显微镜，离心管。

实验材料：人外周血细胞，HeLa 细胞，CHO 细胞或其它细胞。

四、操作步骤

（一）阻断细胞于 G1/S 期交界处的 TdR 双阻断法：

1. 在含有 10%小牛血清，0。3ml　PHA（浓度同前面的实验）的 5ml RPMI -1640 培养液中接种 0。3—0。4ml 人外周血。
2. 置 37℃恒温培养箱内培养 72 小时。
3. 72 小时后，向培养瓶内加入 TdR 至终浓度 2mM，继续培养 17-19 小时。
4. 移培养物于有盖离心管底，1000rpm 离心 8 分钟，收集细胞沉淀，用新鲜的不含 TdR 的培养液（37℃）悬浮细胞，1000rpm 离心，收集细胞，如此洗涤细胞 3-4 次，去除 TdR。
5. 加入新鲜温浴好的培养液，继续培养 9 小时后，加入 TdR 再次阻断 16 小时。
6. 用新鲜培养液（不含 TdR）清洗三次，进行释放，这时的细胞大部分处于 G1 /S 交界处，随释放时间的推移，同步化细胞逐渐进入 S 期。

（二）机械振荡法收集 M 期同步化细胞：

1. 选用 CHO 细胞培养于含 10%小牛血清 Eagle 培养中，使用若干大型 100ml 的方型培养瓶，每瓶接种细胞数为 2×10^6 个。
2. 37℃恒温培养约 30 小时，细胞进入对数增殖期，这是细胞呈单层帖壁生长。
3. 将水平方向轻轻摇动培养瓶，弃去旧培养液，换入新鲜温浴的培养液，37℃继续培养，此目的在于除去漂浮和游离的间期细胞，死亡细胞或细胞碎片。
4. 培养 15 分钟以后，取出，水平方向轻轻摇动 10-15 次，将带有振荡下来的细胞的胰液收入无菌离心管，4℃保存。再向培养瓶中加入新鲜温浴培养液。
5. 为获得较多的 M 期细胞，可以每隔 15 分钟，按步骤 4 收集一次细胞悬液，贮存。
6. 将所有细胞悬液置于一大的离心管中，以 1000rpm 离心 10 分钟，吸出上清，改换新鲜温浴的培养液，轻轻打匀，放入 37℃温箱内培养。此时大约有 90%的细胞进行 M 期同步分裂。

五、实验报告

1. 详述以上两种同步化方法的异同，两种方法有何应用价值。

实验十八　动物染色体分带技术

一、实验目的：

1. 掌握动物细胞染色体 G-显带基本技术及其意义。
2. 加深对染色体结构与性质的认识。

二、实验原理

近代的染色体显带始于 Caspersson 及其同事，以及 Pardue 和 Gall 的开拓性研究，前者运用荧光素 QM 使染色体的不同区段出现亮暗相间带纹，后者在原位杂交中使染色体的着丝区域染上深色，随后相继出现了 Q、G、C、R、N、T、Cd 等多种类型的显带技术，显示染色体的许多亚结构。本实验着重介绍动物细胞染色体中常用的一种 G-显带技术。

G-带的形成与 Giemasa 染料的组成的染色特性是分不开的。Giemsa 染料是由不同噻嗪染料混合物（最重要的是天青）和伊红组成。染色体的着色有赖于在原位形成噻嗪-伊红（2：1）沉淀物。着色过程是首先二个噻嗪分子与 DNA 结合，然后再与一个伊红分子结合；其次是需要一个疏水环境，以利于染料沉淀物的累积。染色体上含有高浓度的疏水必蛋白的区域，有利于噻嗪-伊红沉淀物的形成。这些区域相当于含高比例二硫键的氧化态蛋白质区域，经过一系列处理后显示暗带，而另一些区域（明带区）则为含疏基的还原态蛋白质，为亲水性蛋白质对染料的亲和力低，所以不易显色。这表明在 G-带的形成过程中，蛋白质状态是一个很关键的因素。这与染色体的功能有关。如果染色体上某一区域的 DNA 为重复序列，转录活性低，相应地包装它们的蛋白质的也较稳定，可能通过较强的二硫键形成很稳定的疏水的α-螺旋结构，成为染料沉淀物沉积的环境，从而显示出阳性带，相反如果染色体上某一区域的 DNA 富含具转录活性的结构基因，则功能上相对活跃。包装它们的蛋白质也较疏松，构象上类似β-折叠结构，经处理后，二硫键断裂，还原为疏基，成为亲水性蛋白质不利于染料沉淀物的积累，所以着色浅，显示阴性带。关于 G-带的显带机理还需进一步探讨。

G-带有许多优点：染色是永久性的，标本保存时间长，带纹通常较稳定，有利于染色体的结构分析，以及物种之间染色体同源性的比较。

三、试剂和器材

试剂：

1. GKN 10×贮存液：葡萄糖 10g，KCl 14g，NaCl 80g，$NaHCO_3$ 3.5g，蒸馏水加至 1000ml。
2. GKN 工作液：贮液稀释 10 倍。
3. 0。25%的胰蛋白酶储存液：胰蛋白酶 2。5g，用 GKN 加至 1000ml（pH7。4）。
4. 胰蛋白酶工作液：0。25%胰蛋白酶储液 1ml，GNK 4ml，Versene 液 5ml，0.05g $NaHCO_3$。
5. Versene 液：EDTA 0。2g，NaCl 8g ，KH_2PO_4 0.2g，KCl 0.2g，$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1.55g（或 Na2HPO4 • 2H2O 3.1g）。
6. Giemsa 染液：原液 2ml 加入 1/15M（pH6.8）磷酸盐缓冲液（100ml）。
7. 1/15M（pH6.8）磷酸盐缓冲液配制同前。

器材：

温箱、水浴（30℃）、量筒（100ml）、显微镜、烧杯、玻棒、立式染缸分析天平、试剂瓶、染片架等。

实验材料：

制备好的未染色的人淋巴细胞染色体标本。

四、操作步骤

1. 空气干燥的人染色体标本，在 37℃温箱内处理 3-24 小时。
2. 标本在 0.025%的胰蛋白酶工作液内处理 30-70s。
3. 在 GKN 工作液内漂洗 30s。
4. 用 2%Giemsa 染液染色 5-10 分钟。
5. 自来水细流冲洗，空气干燥。
6. 二甲苯透明，封片。

五、实验报告

1. 说明 G-显带原理，画出显带的染色体草图。
2. 在玻片上写上姓名、年、月、日，交与老师。

实验十九　线粒体的显示

一、实验目的：

1. 观察光镜下线粒体的形态。
2. 掌握线粒体的基本染色方法。

二、实验原理：

线粒体是遍布真核细胞中的一种重要的细胞器，是糖，脂肪酸及氨基酸最终氧化生成 ATP 的场所。

线粒体形态多样，有短棒状、园形、线形、哑铃形等，其大小范围，短径可在 0.3-1um，长径可在 0.4-3.0um。

光学显微镜下观察线粒体的方法有固定染色法和活细胞染色两大类，现介绍如下：

1、固定细胞染色法——Heidenhain 铁苏木精染色法

制作固定染色的线粒体标本，动物常取小白鼠的肝，肾，小肠等。线粒体一般均采用石蜡切片，本次实验采用 Regaud 固定液，其中重络酸钾是强氧化剂，能凝固蛋白质和类脂，而不使其沉淀，有利于保护线粒体的结构，使其更接近于生活状态。由于固定后长久铬化使组织块变脆，因此酒脱水的时间应尽量缩短，勿超过 2 小时，帮要用苯而不用二甲苯透明，

以防组织过度硬化。浸蜡时须避免高热，故用 50℃软蜡，包埋成蜡块时改用 60℃硬蜡，以利切成 3-4um 的薄片。切片不宜过厚，否则线粒体相互重叠，不利于染色和观察。

Heidenhain 铁苏木精染色法操作简单，染色的标本不易褪色，能长久保存，除线粒体外，对组织中其它结构如染色体，中心体，肌原纤维，张力原纤维，酶原颗粒等染色效果也好，是组织学染色的基本方法之一。

2、活细胞染色法——健那绿（Janus Green B）染活细胞线粒体。

健那绿是对线粒体专一的活细胞染料，具脂溶性，能跨过细胞膜。解离后，有染色能力的基因带正电，结合在负电性的线粒体内膜上。内膜的细胞色素氧化酶使染料保持氧化状态，呈现兰绿色，而在胞质内，染料被还原成无色。

线粒体浸没在染液中能维持活性数小时，使我们能够直接观察到生活状态线粒体的外形分布及运动。

三、试剂和器材

试剂①：Regaud 固定液：

3%重铬酸钾水溶液 80ml + 36% 甲醛 20ml。

2.5% 铁明矾水溶液，50%、70%、90%、100%酒精、苯、二甲苯、中性树胶、蛋清甘油、石蜡、生理盐水。

1% 苏木精染液：

苏木精 1g +无水乙醇 10ml，溶解后加蒸馏水 90ml，静置 4—6 周使其氧化成熟，或直接加入 0.1g 碘酸钠使其氧化。

1% 健那绿染液：

健那绿 0.5g ＋生理盐水 50ml，加温到 30－40 ºC 使其充分溶解，此染液宜新鲜配制，以保持被氧化的能力。

器材：

1.剪刀、镊子、石蜡切片设备、染色缸。

2.牙签、载（盖）玻片、显微镜。

实验材料：

1.小白鼠。

2.单层培养细胞或口腔上皮细胞。

四、操作方法：

Heidenhain 铁苏木精染色法：

1.将小白鼠拉颈椎处死，迅速取出肝组织，用生理盐水洗净血迹。切成每边 3-4mm 大小的块。

2.组织小块投入 Regaud 固定 4 天，每天换新鲜固定液，固定以后，在重铬酸钾水溶液

中铬化 7 天，流水冲洗 1 天。

3.经 50%→70%→90%→100%酒精上行脱水共 2－3 小时，苯透明半小时。

4.常规石蜡包埋，切片，蛋白甘油粘片。苯脱蜡，经各级酒精下行入水。

5.媒染：浸入 2.5% 铁明矾水溶液中 2-12 小时，蒸馏水洗。

6.染色：入 1% 苏木精染液中染色 12 小时，蒸馏水洗。

7. 入 2.5% 铁明矾水溶液分色于线粒体呈深蓝色或兰黑色，而其它部分无色。

8.自来水洗 15－60 分钟，蒸馏水洗两次。

9.经 70%→90%→100%酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

结果如下：线粒体，染色体，中心体均呈深蓝色至兰黑色。注意间期无染色体，中心体也看不见，至有线粒体可见。

健那绿染活细胞线粒体：

1.用牙签刮下口腔粘膜上皮细胞涂于洁净的玻片上。

2.滴加 1%健那绿染液室温下染色 10 分钟，盖上盖玻片，盖玻片下两侧可放头发丝支撑，使其不压迫细胞病能蓄纳较多染液。

3.如果观察时间较长，可适当添注染液。

结果如下：用 40×物镜观察，即可见蓝绿色的线粒体，细胞质接近无色，注意健那绿有轻微毒性，如染色过久，线粒体可能发生溃变，出现空泡。

五、试验报告：

1.画出线粒体在细胞内的分布图。

2.阐述各染色体的基本原理。

实验二十　植物愈伤组织培养以及再分化

一、 实验目的

了解培养基母液的配制方法和注意事项；掌握培养基的配制和灭菌方法，掌握植物组织培养的一般方法

二、 实验原理

（一）植物细胞的全能性

植物细胞的全能性即是每个植物的本细胞或性细胞都具有该植物的全套遗传基因，因此在一定培养条件下每个细胞都可发育成一个与母体一样的植株。这个概念虽然在本世纪初已经提出，但在当时的技术条件下，在实践上并没做到，经过几十年来组织培养技术的不断改

进，目前细胞的全能性不但在理论上完全被证实，而且为组织培养在实践上的应用奠定了基础。

植物细胞要表现出全能性，须经过几个步骤：

成熟细胞→分生细胞→胚状体→完整植株。

成熟细胞→愈伤组织→出根出芽→完整植株。

脱分化也就是已经分化定型的细胞，经过诱导成为重新恢复了分裂能力（也就是成为分生状态）细胞的过程。

不但植物体细胞可以表现全能性，花粉在培养条件下也可能进行脱分化，通过愈伤组织或胚状体发育成单倍体植株。

诱导细胞的脱分化，需要许多外界条件。任何一个分化的细胞都具有保持分生组织状态的潜势，不过它平常处于受抑制的状态，消除抑制作用就可以使细胞恢复分裂。在各种外界条件中，外源激素对脱分化起重要作用。有些植物的外植体仅需加入生长素（IAA"吲哚乙酸"，NAA"萘乙酸"，2，4-D）即可诱导细胞的分裂与生长，如菊苣；有的仅需加入加细胞激动素类，如大豆、萝卜；另一类需加生长素和细胞激动素类，如烟草髓、胡萝卜、马铃薯；还有一类不需加任何激素，如冠瘿组织，烟草肿瘤组织。

（二）组织的分化与器官建成

外植体诱导出愈伤组织后，经过继代培养，可以在愈伤组织内部形成一类分生组织（meristemoid）即具有分生能较往年小细胞团，然后，再分化成不同的器官原基。有些情况下，外植体不经愈伤组织而直接诱导出芽、根。所以器官发生有两种方式，即直接和间接的。

（1）外植体→器官发生（根、芽或胚状体）→再生植株。

（2）外植体→愈伤组织→类分生组织→根、芽→再生植株。

根是组织培养中易形成的器官，形成芽的培养基条件常有不同，有时芽与根可以同时在组织培养中形成，一般说，培养物中形成的芽如胡萝卜悬浮培养，油菜愈伤组织等。在组织培养中通过根、芽诱导再生植株方式有三种：一种在芽产生之后，于芽形成的基部长根而形成小植株，一种是在根上生长出芽来，另一种即在愈伤组织的不同部位分别形成芽和根，然后两者结合起来形成一株植物。

（三）培养基的组成

培养基中各成分的比例及浓度与细胞或组织的生长或分化所需要的最佳条件相近似成功地使用该培养基进行组织培养的主要条件。营养培养基一般由无机营养、碳源和能源、维生素、植物激素（生长调节剂）和包括有机氮、酸和复杂物质的添加剂组成。

1、无机营养：矿质元素（矿物质）对植物的生命非常重要。例如：Ca 是细胞壁的组成成分；氮是氨基酸、蛋白质、核酸和维生素的重要组成成分；镁是叶绿素的组成成分；铁、锌和钼是某些酶的组成成分。除了 C、H、N、O 外，还有 12 种其他元素是植物生长所必需的。植物

对元素的需求浓度大于 0.5mol/L 时，这些元素称为大量元素；而需求浓度小于 0.5mol/L 的元素则成为微量元素。和一般植物对元素的需求一样，多种盐能满足组织培养对微量元素和大量元素的需求。N、K、P、Ca、S、Mg 为大量元素。必需的微量元素有 Fe、Mn、B、Cu、Zn、I、Mo、Co，植物对这些元素的需求量为微摩尔每升数量级。为了获得最大的生长速度，每种营养成分的最佳浓度可以有相当大的变化。当矿物盐溶解在水中时，他们被解离。培养基中的活化因子是不同种类的离子，而不是化合物。因此，通过对培养基中不同种类离子浓度的测定，就可以对两种培养基做出比较。在大多数情况下，一种营养培养基所含的无机氮在 25~60mmol/L 之间。细胞能够在硝酸盐单独存在的情况下生长，但是在更多的情况下，铵或者其他还原态氮对植物的生长又明显的好处。另外，当培养基中仅含硝酸盐时，pH 会升高。当培养基中同时含有硝酸盐和少量的铵化合物时，pH 的这种变化就会被抑制。硝酸盐和铵的应用范围分别在 25~40mmol/L 和 2~20mmol/L。对铵的响应得变化从抑制到必需依赖于组织类型和培养目的。在铵的量超过 8mmol/L 的情况下，或者组织生长在仅含这种氮素的培养基中时，培养液中也应该含有柠檬酸盐、苹果酸、琥珀酸或者其他 TCA 循环中的酸。大多数植物选择硝酸盐而不是铵，相反的情况也存在于另外一些植物中。钾的需要浓度为 2~26mmol/L，钾一般以硝酸盐或氯化物的形式提供，钠不能代替钾。浓度为 1~3mmol/L 的 Ca、硫酸盐、磷酸盐和 Mg 通常能满足要求。培养基中的 Fe 通常以螯合物的形式加入，当 pH 达到 8 时，这种形式的 Fe 仍可利用。

2、碳源和能源：没有例外，标准碳源是蔗糖或葡萄糖。果糖也可以作为碳源，但是效果要差一些。培养基中的蔗糖可以迅速地转化为葡萄糖和果糖。葡萄糖首先被利用，然后是果糖。培养基中的蔗糖浓度一般为 2%~5%。其他的碳水化合物，包括乳糖、麦芽糖、半乳糖和淀粉也被使用做碳源，但是这下化合物的效果一般比蔗糖和葡萄糖差。大多数培养基含肌醇，其浓度约为 100mg/L。肌醇可以改善细胞的生长。

3、维生素：正常植物（相对离体植物而言）可以合成其生长和发育所需要的维生素。但是，植物细胞的体外培养需要在培养基中加入维生素。维生素 B1 是植物生长和发育所必需的。烟酸和维生素 B6 可以改善细胞或离体植物的生长。一些培养基中含泛酸、生物素、叶酸、对氨基苯甲酸、氯化胆碱、核黄素和抗坏血酸。

4、生长调节剂：激素是高等植物合成的有机化合物，它们影响植物的生长和发育。植物激素的量很小，而且通常在产生它们的部位以外的地方作用。除了自然化合物，人们还合成了与自然激素相同的化合物。所有这些激素统称为生长调节剂。主要的生长调节剂有两类，它们在职务组织培养中具有特殊的重要性：

⑴生长素 生长素的共同特点是它们具有能导致细胞分裂和形成愈伤组织的性质。生长素引起细胞分裂、细胞生长和组织增大及不定根的形成。它经常抑制不定芽和腋芽的形成。当生长素的浓度较低时，不定根的形成占主导地位，然而，当生长素的浓度较高时，愈伤组织能

够形成，而根不能够形成。最常用的高效化合物是 2，4—二氯苯氧乙酸（2，4—T）。其他可以使用的生长素是萘乙酸（NAA）、吲哚丁酸（IBA）、2，4，5—三氯苯氧乙酸（2，4，5—T）、对氯苯氧乙酸（pCPA）和毒莠定。

⑵细胞分裂素 细胞分裂素是腺嘌呤的衍生物，它对诱导芽的产生具有重要作用。最常用的细胞分裂素有激动素、苯甲基嘌呤（BA）或 6—苄氨基嘌呤（BAP）、玉米素和异戊烯基嘌呤（2iP）。这些化合物通常被用于刺激植物生长和发育。当把它们和生长素一起使用时，通常可以促进细胞分裂，高浓度的（1~10mg/L）时可以诱导不定芽的形成，但是根的形成一般被抑制。它们通过降低顶端优势促进侧芽的形成。

⑶其他激素 赤霉素通常被用于植株的再生。一般情况下，赤霉素可以使节间生长、引起离体分生组织或芽的生长。赤霉素通常抑制不定根和不定芽的形成。

脱落酸是诱导胚形成的一个重要的生长调节剂。

5、有机添加剂：培养的正常细胞能够合成其所需要的所有氨基酸，但是，当其中含有氨基酸（如谷氨酸）形式的有机氮和核苷酸存在时是有益的。外加氨基酸要慎重，因为这些氨基酸可能成为抑制剂。

6、胶凝剂：琼脂是一种最常用的凝固剂，它在组织培养中作为支撑物。琼脂的浓度过低，与水的亲和力不强，难以形成有效的支撑；琼脂的浓度过高，培养基就会变硬，妨碍营养向组织中扩散，离体生长将受到负面影响。

有支撑物的液体培养基可以取代固体培养基：

①不含琼脂的液体培养基，以干净的泡沫塑料、玻璃纤维为支撑物

②悬挂在液体培养基中的过滤纸桥

③生长在有玻璃珠的液体培养基中

④位于滤纸下的纤维胶海绵代替琼脂作为液体培养基的载体

7、pH：pH 决定着生物大分子的结构和活性的许多方面。对于外植体的离体培养，合适的营养培养基的 pH 值为 5.0~6.0。一般情况下，pH > 7.0 或 pH < 4.5 时，生长和发育停止。培养基的 pH 在消毒前和消毒后不相同，一般情况下，经过高压消毒后的培养基，其 pH 值回降低 0.3~0.5。pH > 6.0 时，可以得到硬度合适的培养基，而 pH < 5.0 时，琼脂就不能形成令人满意的凝胶。

三、实验步骤

1、向烧杯中顺序加入培养基母液：

大量元素 25ml　　微量元素 2.5ml　　铁盐 2.5ml　　维生素、肌醇和甘氨酸各 2.5ml　　BA 和 NAA 各 2.0ml

2、加入实际配制培养基体积约 2/3－3/4 的蒸馏水，加入 10g 蔗糖和 3.5g 琼脂，将烧杯置于电炉上，搅拌加热使琼脂完全溶化，然后用蒸馏水准确稀释至 500ml，继续加热几分

钟使之混合后分装于 10 个 100ml 三角瓶中，以封口膜封口，用记号笔写上学号和姓名。分装好的培养基置于高压蒸汽灭菌锅中灭菌，灭菌条件为温度 121℃，压力 1.1kg/cm^2,灭菌时间 20min 左右，灭菌后的培养基置于无菌室保存备用。

3、将超净工作台用 75%的酒精擦拭一遍，实验中需要用到的器具（镊子、解剖刀、培养皿）和装培养基的三角瓶也用 75%的酒精擦拭一遍后置于超净工作台中。打开紫外灯和风机，处理 20-30 分钟。

4、双手用肥皂洗净，再用 75%酒精擦拭一遍后，连同用 75%酒精擦拭过的种苗瓶一起进入超净工作台。进入超净工作台后，不得随意出入，以免染菌。实验过程中应尽量避免手直接

5、点燃酒精灯，将镊子和解剖刀在灯焰上烘烤后，插在酒精瓶中；在灯焰附近打开种苗瓶封口，从酒精瓶中取出镊子和解剖刀，灯焰上烘烤后切取种苗于培养皿，使用过的镊子和解剖刀放回酒精瓶（实验中使用镊子和解剖刀前均需在灯焰上烘烤灭菌，使用完后放回酒精瓶；在接种时，镊子应尽量多烘烤一段，以防镊子插入过深时，致使培养物染菌）；瓶口和封口膜内侧灯焰上烘烤后封口；实验过程中应尽量避免手直接接触外植体材料。

6、从分生部上沿切取一段约 1cm 左右的种苗茎，切好的外植体上应保留一片苗叶，若叶片上有萎黄部位，切除之。

7、在灯焰附近打开培养基瓶封口，接种过程中，培养基瓶口应一直对准灯焰，手不得接触封口膜内侧；将切好的外植体材料垂直插入培养基中，一瓶接种 1-2 个。此过程应尽快完成后封口。

8、接种好的三角瓶 24℃培养。2 天后观察，若有染菌需重做。一周后愈伤组织可形成。继续分两组培养：一组 24℃光照培养，另一组 24℃黑暗环境下培养，观察两组培养物再分化情况。

四、实验报告

1、 记录培养基的配置过程

2、 培养基凝固状况

3、 记录接种过程

4、 记录叶片生长状况、接种外植体大小；每瓶接种数、接种总瓶数。

5、 愈伤组织诱导结果：愈伤组织诱导率；愈伤组织状态、大小；不同光照形成的愈伤组织状态描述；污染率统计

编号	每瓶接种数	培养条件（暗、光）	愈伤组织诱导率（%）	愈伤组织状态	污染率（%）

愈伤组织诱导率＝愈伤组织数/接种外植体数

6、 记录再分化情况

接种瓶数，每瓶接种量。愈伤组织再生植株统计

编号	愈伤组织来源	分化率（%）	每个愈伤组织分化芽数	分化芽状态	污染率（%）

1、分化率的差异显著性分析

2、芽分化数的差异显著性分析

实验二十一　肿瘤细胞培养实验步骤

一、实验目的

了解培养基母液的配制方法和注意事项；掌握培养基的配制和灭菌方法，掌握动物细胞培养的一般方法

二、实验原理

（一）、实验用具的清洗

1、玻璃器皿的清洗

组织细胞培养中，使用量最大的是玻璃器皿，故工作最最大的是玻璃器皿的清洗。一般玻璃器皿的清洗包括浸泡、刷洗、侵酸和冲洗四个步骤。清洗后的玻璃器皿仅要求干净透明无油迹，而且不能残留任何物质。

（1）浸泡：新瓶使用前应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸液浸泡过夜，以中和其中的碱性物质。再次使用的玻璃器皿则常附有大量刚使用过的蛋白质，干固后不易洗掉，故用后要立即浸入水中，且要求完全浸入，不能留有气泡或浮在液面上。

（2）刷洗：浸泡后的玻璃器皿一般要用毛刷沾洗涤剂刷洗，以除去器皿表面附着较牢

的杂质。刷洗要适度，过度会损害器皿表面光泽度。

（3）浸酸：浸泡时器皿要充满清洁液，勿留气泡或器皿露出清洁液面。浸泡时间一般为过夜，不应少于 6 小时。

（4）冲洗：玻璃器皿在使用后，刷洗及浸泡后都必须用水充分冲洗。使之尽量不留污染或洁液的残迹。冲洗最好用洗涤装置。即省力、效果又好。如用手工操作，则需流水冲洗十次以上，每天水须灌满及倒干净，最好用蒸馏水清洗 3-5 次，晾干备用。

2、胶塞的清洗

先用自来水冲洗，再做常规处理，常规清洗方法是：每次用后立即置入水中浸泡，然后用 2% NaOH 或洗衣粉煮沸 10-20 分钟，以除掉培养中的蛋白质。自来水冲洗后，再用 1%稀盐酸浸泡 30 分钟或蒸馏水冲洗后再煮沸 10-20 分钟，晾干备用。

3、塑料制品的清洗

塑料自制品现多是采用无毒并已经特殊处理的包装，打开包装即可用，多为一次性物品。必要时用 2% NaOH 浸泡过夜，用自来水充分冲洗，再用 5%盐酸溶液浸泡 30 分钟，最后用自来水和蒸馏水冲洗干净，晾干备用。

（二）、灭菌和消毒

培养液、橡胶制品、10 磅 10 分钟；

布类、玻璃制品、金属器械、18 磅 20 分钟。

（三）、培养基的配制

1、平衡盐溶液（BSS）主要是由无机盐和葡萄糖组成。BSS 中的无机离子是细胞生命的必要成分，在维持渗透压、缓冲和调节溶液 pH 方面也起着重要作用，另外，Ca^{2+}、Mg^{2+}能为酶系统的活化提供条件，也是细胞膜的重要组成成分。葡萄糖等为细胞代谢提供能量。作为核酸分子的合成也需要 S、P 等作为基质。BSS 内还含有少量的酚红，作为 pH 变化的指示剂，溶液变酸性时呈黄包，变碱性时呈紫红色，中性时呈桃红色．以此观察和判定培养液 pH 的变化。目前最常用的 BSS 是 Hanks 液、Earle 液和 PBS 等。在细胞培养中，BSS 主要有如下用途：

(1)作为配制培养基的基础溶液：

(2)配制各种试液：如配“胰酶”消化液。

(3)用于洗涤经织和细胞。

Hanks 培养液：为了便于保存和减少有关成分的化学反应，此液可配成 10 倍浓缩液(10x)的储存液(母液)。其配制方法如下：

⑴、10 x 母液配制法

甲液：取 450ml 三蒸水依次溶解下列试剂

NaCl　　80g

KCl　　4g

$MgSO_4$ 7H20　　2g

$CaCl_2$　　1.48($2H_2O$ 则 1.85g)

$CaCl_2$ 应单独溶解后，再混合；待完全溶解后，补足三蒸水至 500ml。

乙液；取 450ml 三蒸水依次溶解下列试剂

Na_2HPO_4　　0.6g($12H_2O$ 则 1.528g)

KH_2PO4　　0.6g

葡萄糖　　10g

0.4%酚红　　50 ml

应先配好 0．4%酚红溶液待用。配制方法如下：称取 0.4g 酚红，置玻璃研钵个细研，逐渐加入 0.2mol/L 的 NaOH 边滴边研至酚红完全溶解，记好加 NaoH 的量，共加至 12．28ml 为止，将研好的酚红液用吸管移人烧瓶个加三蒸水 88.72ml。

(2)、Hanks 工作液配制法

取上述甲、乙液等量用三蒸水稀释 10 倍，即成使用液。用 67.6kPa 高压灭菌 15min。临用前，用 7.5%$NaHCO_3$ 调至所需 pH。

2、PH 调整液。为了营养成分稳定和延长贮存时间，在配制营养液时都不预先加入 $NaHCO_3$，而在使用前再加人。因此 $NaHCO_3$ 都是单独配制．高压灭菌。

合成培养基大都呈弱酸性，而细胞生长的最适 PH 为 7.0—7.2，可忍耐的 pH 范围是 PH6.6—7.8。pH 到 7.6 时，细胞虽有代谢但不再分裂增殖，故使用培养基时要调整 PH，并注意培养过程中的 pH 变化，以及时换液。常用的 pH 调整液 $NaHCO_3$ 配制如下：

常用的浓度有 7.4%，5.6%，3.7%三种；配制时用三蒸水溶解后，滤过除茵，分装小瓶．盖紧瓶塞，于 4℃或室温保存；有的实验室用 68kPa，10min 高压灭菌，虽有部分 $NaHCO_3$ 被破坏，但操作简单方便。调节 PH 时，$NaHCO_3$ 要逐滴加入，并不时摇动培养液，以防止加人过量。当 PH 值过高后，可用灭菌的 10%醋酸溶液或通人 CO_2 气体调节。

3、合成培养基(Synthetic media)是根据研究和了解细胞所需成分的基础上配制而成的，现已成为普遍应用的商品化的培养基；但合成培养基尚未成为十分完全的培养基。它只能维持细胞不死，但不能促进细胞增殖生长．使用时尚需添加天然培养基，主要是牛血清。目前常用的合成培养基主要是 MEM、Eagle 培养液和 RPMl1640 培养液．还有 199 培养液。

RPMl1640 配制方法：取一袋 RPMl1640(日本产 10．4g／袋，德国产 10．5g／袋粉剂溶于 950ml 三蒸水中，加 2.0g $NaHCO_3$，充分搅拌使完全溶解，用三蒸水定容至 I000ml，用 1mol／L NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8—7.0，滤过除菌(pH 升至 7.0—7.2)，分装后干 4℃或—20℃保存备用。

4、消化液。1%和 0.25%胰蛋白酶溶液的配制方法：

1)将 D—Hanks 溶液用 5.6%NaHC03 调至 pH7.2 左右。

2)称取胰酶粉末 1 克于烧杯中，选用少许平衡盐溶液调成糊状，再补足至 100ml，搅拌均匀，置室温 4 小时或冰箱内过夜，并不时搅拌振荡。

3)选用滤纸过滤，再用无菌玻璃滤器(G6)或蔡氏滤器(EKS2、EKS3)滤过除菌，按 5ml(或 Iml)量分装小瓶，盖紧瓶盖，置低温冰箱保存备用。

4)临用时将其用 D—Hanks 液稀释成 1：4(即 1 份胰酶加 3 份 BSS)，即得到 0．25%的胰蛋白酶溶液。胰酶溶液较酸，使用前再用 5．6%的 NaHC03 调 pH 至 7．2 左右。

5、抗生素液。

⑴配制：以青霉素、链霉素为例，配制如下：

青霉素（钠盐）100 万 u

链霉素（双氢）1g（1000 000μg）

溶于无菌三蒸水 100ml，每毫升含青霉素 10000u，链霉素 10000μg

⑵保存：分装小瓶，—20℃冰冻保存。

⑶使用：99ml 培养液中加入青、链霉素混合液 1ml.最终浓度为青霉素 100u/ml，链霉素 100μg／ml。

6、生长液。在使用合成培养基时，仍需要加入一些天然成分．如人或动物血清，血浆和胎汁等，否则细胞不能很好生长。当前主要使用血清，以牛血清为主。血清的生物效应早已证明，它含有多种促进细胞生长、贴附的活性物质。合成培养基中不加血清或低浓度(如 2%)血清，仅能维持细胞生存，细胞不能很好生长，这种培养基称为维持液。加入 5%的血清，对大多数细胞来说，能维持不死和缓慢生长。一般需加入 10%—20%血清，有利于细胞生长，称为生长液。添加血清，虽利于细胞生长，但不明成分也增多了，对分析实验结果增加了困难。

RPMI1640 生长液和维持液配法

生长液：RPMI1640　　89%

小牛血清　　10%

双抗　　1%

用 5．6%$NaHCO_3$ 调 pH 至 7．0

三、实验操作

1、培养前准备

在开始实验前要制定好实验计划和操作程序。有关数据的计算要事先做好。根据实验要求．准备各种所需器材和物品、清点无误历将共放置操作场所(培养室、题净台)内，然后开始消毒。这样可以避免开始实验后．因物品不全往返拿取而增加 f5 染机会。

2、培养室和超净台的消毒

无菌培养室每天都要用 0.2%的新洁而灭或 2%～5%来苏儿拖洗地面一次(拖把要专用)．紫外线照射 30～50 分钟。超净工作台台面每次实验前要用 75%酒精擦洗。然后紫外线照射 30 分钟。在工作台面消毒时切勿将培养细饱和培养液同时照射紫外线。消毒时工作台面上用品不要过多或重叠放置。否则会遮挡射线降低消毒效果。一些操作用具如移液器、废液缸：、污物盆、试管架等用 75%酒精擦洗后置于台内同时紫外线照射消毒。

3、洗手和着装

进入无菌培养室原则上必须彻底洗手并按外科手术要求着装．无菌服、帽子和口罩每次实验后都要清洗消毒，开始操作前要用 75%酒精或 0.2%新洁尔灭航天消毒手和前臂。如果实验过程中手触及可能污染的物品和出入培养室都要重新用消毒液洗手。平时仅做观察不做培养操作时，可穿经紫外线照射 30 分钟的一般清洁工作服。培养室外最好准备好几套这样的工作服，便于随时进入培养室穿用。

4、无菌培养操作

为保证做到无菌，除实验中所用物品需事先消毒外，在实验中还需保持无茵操作。因此在进行实验前，要点燃酒精灯或煤气灯，一切操作如安装吸管帽、打开或封闭瓶口等，都应在火焰近处并经过烧灼进行。但要注意，金属器械不能在火焰中长时间烧灼，以防退火。烧过的器械要冷却后才能使用，如镊子应冷却后才能挟取组织，否则可能造成组织细胞损伤；已吸过培养液的吸管不能再用火焰烧灼，因残留在吸管内的培养液如蛋白质等烧焦后会产生有害物质，吸管再用时会将其带到培养基中。开启、关闭长有细胞的培养瓶时，火焰灭菌时间要短．防止因温度过高烧死细胞。另外胶塞、橡皮乳头过火焰时也不能时间过长，以免烧焦产生有毒气体．危害培养细胞。

工作台面上的用品要放置有序、布局合理，一般说酒精灯在当中，右手使用的物品在右侧，左手使用得物品在左侧。工作忌忙乱而要有顺序。织织、细胞及培养瓶在未做处理和使用前，不要过早暴露于空气中。应分别使用不同吸管吸取营养液、PBS、细胞悬液及其它各种用液。而不能混用。用吸管、注射器进行转移液体操作时，吸管、注射器针头不能触及瓶口以防止细菌污染或细胞的交叉污染。培养瓶、培养液瓶不要过早打开，已开口者要尽量避免垂直放置以防止下落细菌的污染。放置吸管时管口向下倾斜，以防止液体倒流入乳头内引起污染。

进行培养操作时，不要用手触及已消毒的器皿，如已接触，要用火焰烧灼或取备用品更换。面向操作台时勿大声讲话或咳嗽，以免喷出的唾沫把细菌等带入工作台面发生污染。

5、消化传代

(1)、采用普通消化传代方法．将 0.25%胰蛋白酶注入培养瓶内两次，每次加 1ml(25ml 培养瓶)，稍加摇动让胰蛋白酶流过所有细胞表面，然后倒掉。

(2)、盖好瓶盖，将培养瓶放在倒置显微镜下观察，发现纤维样细胞变圆，部分脱壁，立即加入 2m]有血清培养液终止消化。

(3)、用弯头吸管轻轻吹打细胞生长的区域(可事先在镜下用记号笔在培养瓶上划出记号)，吹打过程中不要用力。吹打结束后，再用少量培养液漂洗一遍，然后加入适量培养液继续培养。若要转瓶培养，可吸取少许含有细胞的培养液，再加入 2ml 培养液培养。

(4)、转接好的细胞放入 CO_2 培养箱中，37℃，5%CO_2 培养 72 小时。每隔 12 小时，轻轻晃动培养液一次。若发现培养液变黄，应及时更换培养液。

四、实验报告

a) 记录实验步骤

b) 记录细胞生长状况

实验二十二　细胞器的分离

一．实验目的：以大鼠肝为例，介绍用差速离心法分离细胞器的一般操作程序

二．实验原理：（略）

三．试剂和器材

（一）试剂：

1 .生理盐水

2 . 0.25mol/L 蔗糖-0.01mol/L Tris-盐酸缓冲液（pH7.4）。配法：

0.1mol/L Tris　10ml　0.1mol/L 盐酸　8.4ml 加双蒸水到 100ml。再向上述缓冲溶液中加蔗糖，使浓度为 0.25mol/L。蔗糖为密度梯度离心用 D（+）蔗糖。

3. 0.34mol/L 蔗糖-0.01mol/L Tris-盐酸缓冲液（pH7.4）。

4. 0.34mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（AC）$_2$ 溶液，用 1mol/L NaOH 调 pH 到 7.4。

5. 0.88mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（AC）$_2$ 溶液， pH7.4。

6. RSB 溶液：0.01mol/L Tris-盐酸缓冲液（pH7.2）,0.01mol/L NaCl，1.5mmol/L $MgCl_2$

7. 比重 d_{20}=1.18 的蔗糖溶液（51.5g/L）。比重 d_{20}=1.16 的蔗糖溶液（51.0g/L）。

8. 1%詹纳斯绿（Janus green B）染液，用生理盐水配制

9. 甲基绿-派洛宁染液。配法：

甲液：2%甲基绿水溶液 14ml　5%派洛宁水溶液 4ml　蒸馏水 16ml

乙液：0.2mol/L 醋酸缓冲液（pH4.8）16ml

将甲液和乙液混合均匀，此染液不宜久置。

10. 卡诺固定液

无水乙醇 6ml　冰醋酸 1ml　氯仿 3ml

11. 丙酮

12. 酸性磷酸酶显示用液

4℃冷丙酮　2%醋酸水溶液　1%硫化铵水溶液（现用现配）

酸性磷酸酶作用液：0.2mol/L 醋酸缓冲液 12ml　5%硝酸铅 2ml

3.2%β—甘油磷酸钠　4ml　蒸馏水　74ml

配制时须缓慢加药，否则将会出现沉淀。其中 0.2mol/L 醋酸缓冲液配法（pH5.0）：

0.2mol/L NaAC　7ml　　0.2mol/L HAC　3ml

13. 葡萄糖-6-磷酸酶显示剂

①作用液：0.125%葡萄糖-6-磷酸钾盐水溶液　4ml　　2%硝酸铅　0.6ml

0.2mol/L Tris-马来酸（pH6.6）　　4ml　　蒸馏水　1.4ml

其中 0.2mol/L Tris-马来酸的配法：

甲液：Tris 2.42g　顺丁烯二酸 2.32g　加蒸馏水到 100ml

乙液：0.8%NaOH 水溶液

按下列比例混合：甲液 25ml　　乙液 21.2ml　　蒸馏水　53.8ml

②1%硫化铵水溶液

③10%中性甲醛固定液：市售 30%甲醛，投入足量碳酸镁振荡，放置 24 小时，以中和其中的甲酸，然后加水稀释 10 倍。

④50%甘油水溶液

（二）器材：

解剖刀剪　漏斗　玻璃匀浆器　尼龙织物　温度计　离心管　冰浴　恒温箱　冰箱　载玻片　盖玻片　显微镜　高速冷冻离心机

（三）实验材料：大鼠

四、实验步骤：

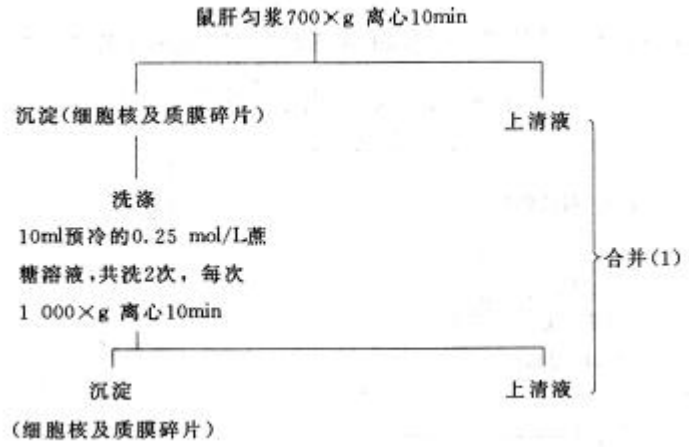
（一）、制备大鼠肝细胞匀浆

实验前大鼠空腹 12h，击头处死，剖腹取肝，迅速用生理盐水洗净血水，用滤纸吸干。称取肝组织 2g，剪碎，用预冷的 0.25mol/L 蔗糖溶液洗涤数次。然后按每克肝加 9ml 冷的 0.25mol/L 蔗糖溶液（分数次添加），在 0~4℃冰浴中用玻璃匀浆器匀浆。匀浆用双层纱布过滤备用

（二）、差速离心

先将 9ml0.35mol/L 蔗糖溶液放入离心管，再沿管壁小心地加入 9ml 大鼠肝匀浆覆盖在上层。按下面各图进行差速离心。

1. 分离细胞核



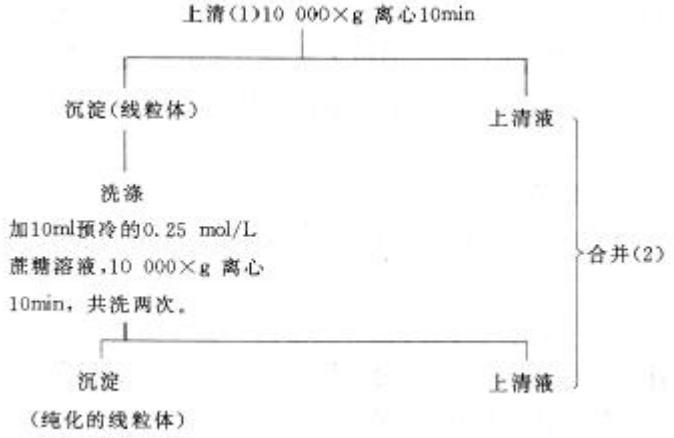
2. 收集质膜

吸出细胞核沉淀中较疏松的上层，混悬于比重 d_{20}=1.16 的蔗糖溶液中，沿管壁小心加入离心管，使其覆盖在等量的比重 d_{20}=1.18 的蔗糖溶液之上。700×g 离心 10min，质膜最终集中在两层溶液的界面上，用尖头细管小心地吸出质膜。

3. 细胞核纯化

将细胞核沉淀悬浮于 5 倍体积的 0.34mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（AC）2 溶液中，铺在 4 倍于核悬液体积的 0.88mol/L 蔗糖-0.5mmol/L Mg（AC）2 溶液之上，1500×g 离心 20min，弃上清，沉淀为纯化的细胞核。在 RSB 溶液中置 4℃可保存数天，在 0.01mmol/L EDTA -0.5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）-5mmol/L MgCl2-25%甘油-50mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH7.4）中，—20℃可保存数月。

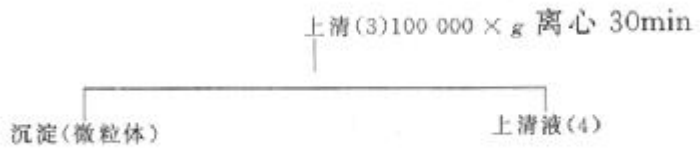
4. 分离线粒体



纯化的线粒体可悬浮于 0.25mol/L 蔗糖溶液中，置—70℃保存。

5. 分离溶酶体

6. 分离微粒体（内质网碎片）



7. 上图上清液经 150，000×g 超速离心可获得核糖体、病毒、生物大分子等。

（三）、分离物的鉴定

1. 细胞核

取细胞核沉淀作稀薄的涂片，入卡诺固定液固定 30min，取出晾干，入甲基绿-派诺宁染色 10~30min，入纯丙酮分色 30s，蒸馏水漂洗，用滤纸吸干水分，40 倍显微镜检查。结果：细胞核呈蓝绿色，核仁和混杂的细胞质 RNA 呈红色。纯化的细胞核上应无大量胞质粘连，背景中完整细胞低于 10%，无细胞碎片。

2. 线粒体

取线粒体沉淀作稀薄涂片，不待干即滴 1%詹纳斯绿染液染 10~20min，扣上盖玻片，显微镜检查，线粒体呈蓝绿色

3. 溶酶体

用酸性磷酸酶显示法鉴定。溶酶体冷沉淀在 4℃预冷的载玻片上涂片，立即入 4℃冷丙酮固定 15~30min。用蒸馏水洗净固定液，滤纸吸干。

入酸性磷酸酶作用液，37℃处理 30min~2h。用 2%醋酸水溶液稍微洗一下片子，蒸馏水洗。

入 1%硫化铵溶液 1~2min。充分水洗。亦可用 0.1%中性红复染，看是否混杂入细胞核及胞质碎片，染 5~10min。甘油-明胶封片（明胶 10g，甘油 12ml，蒸馏水 100ml），镜检。

设置对照片：涂片放湿盒，在 50℃水浴中作用 30min 使酶失活，其余步骤同前。

结果：涂片上布满棕黑色的颗粒，对照片阴性反应。

4. 微粒体

显示其标志酶——葡萄糖-6-磷酸酶鉴定微粒体。取少量微粒体沉淀涂片，不固定，立即入作用液在 37℃孵育 5~15min。蒸馏水轻轻洗。入 1%硫化铵溶液处理 1min。入 10%中性甲醛固定 30min，自来水冲洗。用 50%甘油水溶液封片，镜检。

结果：微粒体呈棕黑色小颗粒。

（四）注意事项

1. 尽可能充分破碎组织，缩短匀浆时间，整个分部分离过程不宜时间过长，以保持组分生理活性。

2. 差速离心要求在 0~4℃进行，如果使用非冷冻控温的离心机，一般只宜分离细胞核和线粒体，同时注意用冰浴使样品保持冷冻。

实验二十二　石蜡切片的制作

一．实验目的：通过对植物材料的固定、脱水透明、包埋、切片等实验操作，了解石蜡切片的基本过程，掌握石蜡切片的制作方法。

二．实验材料：小鼠脏器

三．实验准备：

1．用具：小标本缸，镊子，蜡杯，载玻片，毛笔，刀片，量筒，滴管，酒精灯，小木块，吸水纸，切片机，熔腊箱，展片台，真空泵，解剖针。

2．实验药品及配制：

试剂：70%、85%、95%、100%的酒精, 二甲苯, 甘油蛋白, 固定液, 石蜡。

药品的配制：

卡氏固定液的配制：冰醋酸： 乙醇 =1∶3

甘油蛋白的配制：取鸡蛋的蛋白加入等量的甘油搅拌混合，至均匀为止。加入 1%的麝香草酚，以防止微生物的侵入和腐败。

四．实验步骤：

1．取材固定：用刀片切取实验材料，立即投入盛有卡氏固定液的小杯中。固定液的用

量约为材料的 10-15 倍，固定时间 4-12 小时。

2．洗涤：倒出固定液，加入 70%酒精，隔数小时后再换一次。

3．脱水与透明：将材料从 70%的酒精中取出，顺序放入 85%乙醇（10 分钟）→95%乙醇（10 分钟）→100%乙醇（10 分钟）→二甲苯 1：乙醇 4（10 分钟）→二甲苯 2：乙醇 1（10 分钟）→二甲苯 4：乙醇 1（10 分钟）→二甲苯→二甲苯（抽气 3-5 分钟）。

4．透蜡：

①．透蜡前，先作好准备工作，选取适当熔点的石蜡，融化，分装在（1）号、（2）号、（3）号三个蜡杯内，置入熔蜡箱，（55-60℃）。另外，再准备一杯石蜡，供包埋用，也置于熔蜡箱内。

②．将以透明的材料从二甲苯中取出，防入蜡杯（1）（30 分钟）→蜡杯（2）（30 分钟）→蜡杯（3），半小时后即可包埋。

5．折纸盒。

6．包埋：

①．将热石蜡注入纸盒内，用镊子夹取组织块放入盒的中央位置。

②．将纸盒一半浸入冷水中，待表面石蜡凝成一层膜后，将纸盒迅速全部浸入冷水中，待石蜡全部凝结变硬即可取出。

7．修切蜡块：把包埋好的蜡块用刀片修切成长方形。

8．固定蜡块：取小木块，用蜡铲加上热石蜡，再融化蜡块底面，沾于小木块上，冷却后装在切片机上。

9．切片。

10．展片、贴片：

①．准备好展片台，使温度保持在比包埋石蜡的熔点底 5-6℃。

②．取洁净的载玻片涂以甘油蛋白。

③．在涂有甘油蛋白的载玻片上滴二滴蒸馏水，用刀片将腊带切成适当长度的片段，以小镊子夹取腊带，使浮在玻片的水上。再将玻片放在展片台上，腊带受热自动展开。带完全展平后，用吸水纸吸去多余水分。

五．作业

1．绘制出所观察到切片组织的解剖图。

2．简述石蜡切片的方法步骤。