

3.6.3 实验内容

目录

1. 普通光学显微镜的基本使用方法
2. 细胞化学 Feulgen 染色
3. 植物细胞脱分化与再分化
4. 叶绿体的密度梯度离心与荧光观察
5. 差速离心法分离线粒体
6. 动物细胞培养(鼠肾)
7. 哺乳动物离体贴壁细胞的传代培养
8. 培养细胞的染色体显示、人染色体的组型分析
9. 细胞骨架观察
10. 细胞凋亡观察

具体内容

1. 普通光学显微镜的基本使用方法

【实验背景】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。本实验着重讲解克勒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、克勒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。

【实验方法】利用不同的实验材料在不同的显微镜下观察,比较不同显微镜的观察效果。

【实验材料】洋葱、酵母、水绵

【实验课时】3 学时

2. 细胞化学 Feulgen 染色

【实验原理】福尔根反应是 1924 年创立的特异性显示 DNA 的经典方法,不仅可以对 DNA 进行定位分析,而且还可以用于显微分光光度分析。DNA 经过加热的弱酸水解,分子中嘌呤和脱氧核糖间的糖苷键断开,释放出的游离醛基与 Schiff 试剂反应形成含醌基的紫色产物而显示 DNA 的部位。

【实验方法】取洋葱内表皮,60°C 盐酸水解后 Schiff 试剂染色,镜检观察。

【实验材料】洋葱

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】



图：染色结果。可见细胞细胞核内 DNA 存在的部位呈紫红色

3. 植物细胞脱分化与再分化

【实验原理】植物组织培养是进行植物细胞工程的基础，其理论依据是植物细胞的全能型。已分化的植物体组织可以诱导出脱分化，不断分裂增殖的愈伤组织，利用愈伤组织可以继续诱导分化形成完整的植株。这是植物基因工程的基础。

【实验方法】取迎春花枝条脱毒或无菌烟草叶片无菌操作放入脱分化培养基，暗培养待长出愈伤组织，重新放入分化培养基光培养，可见茎、叶和根的形成。

【实验材料】无菌烟草苗、迎春花枝条

【实验课时】3 学时

4. 叶绿体的密度梯度离心与荧光观察

【实验原理】叶绿体是植物细胞特有的进行光合作用的细胞器，将其完整的分离用于后续研究意义重大。用不同浓度的蔗糖溶液支撑梯度，在离心条件下，叶绿体和比它沉降系数小的细胞组分聚集到梯度交界处。富集的叶绿体吸附荧光染料可以发出橘色荧光。

【实验方法】菠菜叶片剪碎研磨后小心加入提前制备好的梯度溶液中离心，得到富集的粗提叶绿体，将其铺到载玻片上滴加吖啶橙染色，荧光显微镜观察。

【实验材料】新鲜菠菜

【实验课时】3 学时

5. 差速离心法分离线粒体

【实验原理】线粒体是真核细胞特有的能量转换的细胞器，对其结构和功能的研究是在离体线粒体上进行和获得的。通过分级离心可以得到不同沉降系数的细胞组分，染料詹纳斯绿可以鉴定线粒体的特异性。

【实验方法】处死饥饿小鼠，取出肝脏，匀浆，分级离心。固定，染色后镜下观察。

【实验材料】小鼠

【实验课时】3 学时

6. 动物细胞培养(鼠肾)

【实验原理】凡是来源于胚胎、组织器官及外周血，经特殊分离方法制备而来的原初培养的细胞称之为原代培养。细胞培养是现代生物学中应用最为广泛的技术之一。

【实验方法】乳鼠麻醉处死，取肾脏，剪碎，胰酶胶原酶处理后离心，去沉淀悬浮于培养基，12 小时换液，三天后观察培养细胞。

【实验材料】出生一周乳鼠

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

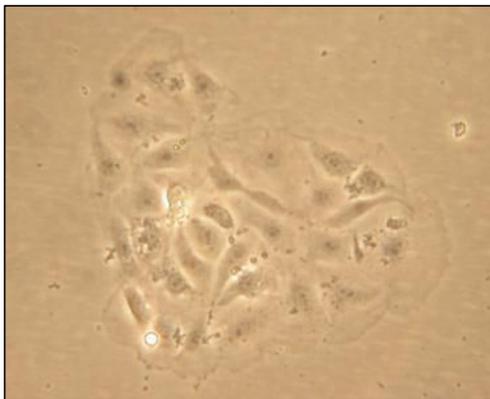


图 倒置显微镜下观察到的原代培养鼠肾细胞

7. 哺乳动物离体贴壁细胞的传代培养

【实验原理】离体贴壁培养的细胞增殖汇合形成单层细胞，当群体达到饱和密度时，必须进行传代。传代过程是通过胰蛋白酶消化将细胞从培养瓶（皿）上脱落并分散成单细胞，计数后适当稀释从旧培养瓶（皿）转移到新培养瓶（皿）并给予新鲜培养液进行再培养。这种传代过程称为传代培养。

【实验方法】长满细胞的培养瓶，弃去培养基，PBS 洗过后加入消化液，待细胞悬浮后离心

收集细胞，1:3 接种，48 小时后观察

【实验材料】贴壁培养细胞 L929

【实验课时】3 学时

8. 培养细胞的染色体显示、人染色体的组型分析

【实验原理】显示染色体主要是显示分裂中期细胞，因为细胞处于分裂中期时，染色体的长短和大小恰到好处，是研究染色体的最好阶段。哺乳动物细胞内有几十条染色体，相互交错缠绕，密集在细胞中，必须把它们分散开，才便于观察。采用加入秋水仙素，使分裂细胞阻断在有丝分裂中期，再经离心，低渗处理，固定，滴片等步骤，可以制备出较好的细胞染色体标本。

【实验方法】离心收集秋水仙素处理的培养细胞，经低渗处理，滴片，固定，染色，镜检

【实验材料】贴壁培养细胞 L929

【实验课时】3 学时

9. 细胞骨架观察

【实验原理】免疫荧光技术就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体上，与相应的抗原结合后，在荧光显微镜下通过特异性荧光观察抗原表达与分布的一种实验技术。间接免疫荧光技术是指先用未标记的特异抗体（第一抗体）与含抗原标本进行反应，洗去未反应的抗体后再用荧光素标记的抗抗体（第二抗体）与抗原标本反应，使之形成抗原—抗体—抗体复合物，进行观察。

【实验方法】培养细胞固定打孔封闭后先后加入一抗、二抗孵育，荧光显微镜观察

【实验材料】Hele 细胞

【实验课时】4 学时

【代表性实验结果】

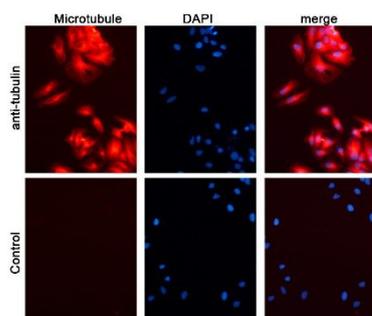


图 实验组和对照组（不加一抗）的观察结果。

10. 细胞凋亡观察

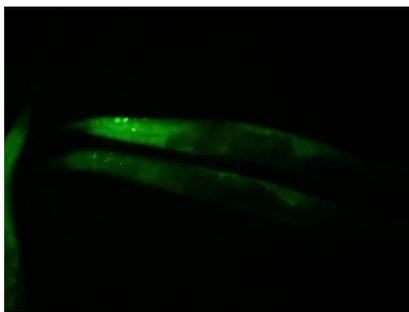
【实验原理】1976年，Sulston 和 Horvitz 利用秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）研究发现，其约 13% 的体细胞在胚胎发育中注定死亡，使得人们认识到细胞凋亡的遗传基础。

【实验方法】荧光染料活体染色线虫，观察

【实验材料】秀丽线虫

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】



图：凋亡细胞由于染色体片段化，可以吸收较多的染料，呈亮绿色。