

《细胞生物学实验》部分

由汤华编写

2007 年 5 月

目 录

第二部分 细胞生物学实验	2
实验一 细胞大小的测量.....	2
实验二 细胞膜的渗透性.....	5
实验三 线粒体的活体染色与观察.....	7
实验四 线粒体的分离制备与观察.....	9
实验五 植物液泡的活体染色与观察.....	12
实验六 叶绿体的分离与荧光观察.....	14
实验七 细胞内过氧化物酶的观察.....	17
实验八 细胞内含物的观察.....	19
实验九 细胞骨架的光学显微镜观察.....	23
实验十 植物原生质体分离和活性鉴定.....	26
实验十一 聚乙二醇法诱导的细胞融合.....	29
实验十二 细胞中DNA的Feulgen染色观察.....	31
实验十三 DNA和RNA的甲基绿-派洛宁原位染色法.....	35
实验十四 植物染色体结构与Giemsa分带技术.....	37
实验十五 染色体核仁组织区的银染法.....	41
实验十六 细胞凋亡的检测.....	44
实验十七 染色体荧光原位杂交技术.....	47
附录 1 细胞生物学实验室守则.....	53
附录 2 细胞生物学染色技术.....	55
附录 3 生物绘图与临时装片知识.....	57
附录 4 实验报告的书写.....	59
参考资料.....	60

第二部分 细胞生物学实验

实验一 细胞大小的测量

【实验目的】

- 1.学会测微尺的使用和计算方法。
- 2.学习和掌握测量细胞大小的基本方法。

【实验原理】

细胞长度、宽度、面积、体积的测量，是研究细胞生理活动和形态特点的重要手段。应用显微镜的成像原理，同时借助显微镜的镜台测微尺和目镜测微尺，两尺配合使用，进行测量和运算，可得出细胞的大小。

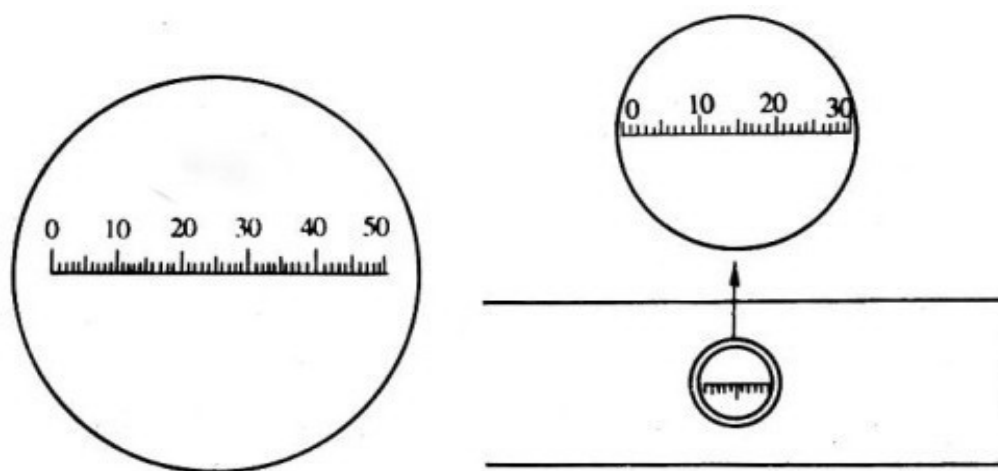


图1 目镜测微尺和镜台测微尺

目镜测微尺（ocular micrometer）是一块圆形玻片，在玻片中央把5mm长度刻成50等分，或把10mm长度刻成100等分，每5小格间有一长线相隔。测量时，将其放在接目镜中的隔板上（此处正好与物镜放大的中间像重叠）来测量经显微镜放大后的细胞物象。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同，目镜测微尺每格实际表示的长度也不一样，因此目镜测微尺测量微生物大小时须先用置于镜台上的镜台测微尺校正，以求出在一定放大倍数下，目镜测微尺每小格所代表的相对长度。

镜台测微尺（stage micrometer）是中央部分刻有精确等分线的载玻片，一般将1mm等分为100格，每格长 $10\mu\text{m}$ （即0.01mm），是专门用来校正目镜测微尺每格长度的。

校正时，将镜台测微尺放在载物台上，镜台测微尺随着显微镜总放大倍数的放大而放大，从镜台测微尺上得到的读数就是真实的尺寸大小。由于镜台测微尺与细胞标本是处于同一位置，都要经过物镜和目镜的两次放大成像进入视野，所以用镜台测微尺的已知长度在一定放大倍数下校正目镜测微尺，即可求出目镜测微尺每格所代表的长度，然后移去镜台测微尺，换上待测标本片，用校正好的目镜测微尺在同样放大倍数下测量，即可得到细胞的大小。

表 1 目镜测微尺量测倍率比照表

物镜倍数	目镜倍数	一格单位(μm)
4	10	25.0 μm
10	10	10.0 μm
20	10	5.0 μm
40	10	2.5 μm
100	10	1.0 μm

【材料、器具与试剂】

(一) 材料:

九里香, 扶桑花, 少花龙葵, 南瓜, 凤仙花的新鲜花朵的花粉粒, 洋葱鳞茎, 口腔上皮细胞。

(二) 器具:

目镜测微尺, 镜台测微尺, 光学显微镜, 尖头镊子, 解剖针, 载玻片, 盖玻片, 滴管、吸水纸, 牙签, 刀片。

(三) 试剂:

蒸馏水, 生理盐水, 0.1M 碘液。

【实验内容及步骤】

(一) 测微尺的操作方法

1. 卸下目镜的上透镜, 将目镜测微尺有刻度一面向下装在目镜镜面上, 再旋上目镜的上透镜。

2. 将镜台测微尺有刻度一面朝上放在载物台上夹好, 使镜台测微尺刻度位于视野中央。先用低倍物镜观察, 调焦至看清镜台测微尺的刻度。

3. 小心移动镜台测微尺, 同时转动目镜, 使目镜测微尺与镜台测微尺平行靠近, 使两尺左边的"0"点刻度线对齐, 进一步靠近使直线接近重合, 然后由左向右找出两尺另一次对齐重合的直线。

4. 记录两条重合线间目镜测微尺和镜台测微尺的格数。按下式计算目镜测微尺每格的长度等于多少 μm 。(目镜测微尺和镜台测微尺两个重合点的距离越长, 则所测得的结果越准确)

$$\text{目镜测微尺每格的长度} = \frac{\text{镜台测微尺的格数}}{\text{目镜测微尺的格数}} \times 10 \mu\text{m}$$

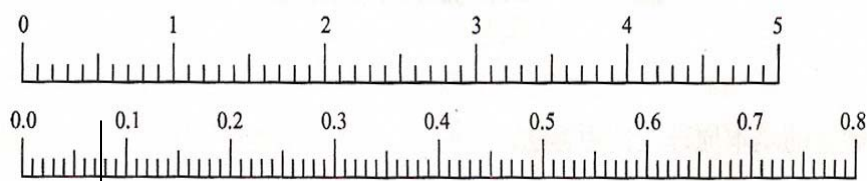


图 2 目镜测微尺与镜台测微尺实际长度的测算

5.计算目镜测微尺每格的长度。例如：测得某显微镜的目镜测微尺 50 格相当于镜台测微尺的 7 格，则目镜测微尺每格长度为： $7/50 \times 10 \mu\text{m} = 1.4 \mu\text{m}$ /格。

(二)花粉细胞大小的观察测量

- 1.采集刚开放或将要开放的成熟花朵；
- 2.在载玻片滴 1~2 滴蒸馏水；
- 3.用解剖针将花粉分散于蒸馏水上，盖上盖玻片，用吸水纸吸去多余水分；
- 4.在显微镜下观察，用目镜测微尺测量 10 个不同花粉细胞的直径大小的格数，根据校准的目镜测微尺每隔的实际长度进行换算，计算平均值。

(三)洋葱内表皮细胞大小的观察测量

- 1.切取小块洋葱鳞茎，用尖头镊子撕取其内表皮；
- 2.将内表皮平展在载玻片上，滴 1 滴蒸馏水；
- 3.盖上盖玻片，压片，用吸水纸吸去多余水分；
- 4.在显微镜下观察，用目镜测微尺测量 10 个不同洋葱内表皮细胞的长度和宽度的格数，根据校准的目镜测微尺每隔的实际长度进行换算，计算平均值。

(四)人口腔上皮细胞大小的观察测量

- 1.取干净载玻片，滴 1 滴生理盐水；
- 2.用灭菌的牙签的平头端，在口腔颊稍用力轻刮，获取口腔上皮细胞；
- 3.将牙签取下的细胞释放到载玻片是生理盐水中，为保证效果，可将取样的牙签平头在溶液中多搅动几次。
- 4.盖上盖玻片，压片，用吸水纸吸去多余水分；
- 5.在显微镜下观察，用目镜测微尺测量 10 个不同口腔上皮细胞的长度和宽度的格数，根据校准的目镜测微尺每隔的实际长度进行换算，计算其平均值。

(五)测微尺用完后的处置方法

- 1.细胞大小测定实验结束后，取出目镜测微尺，将目镜放回镜筒。用擦镜纸擦去目镜测微尺上的油腻和手印。如用油镜，则可按油镜使用方法处理。
- 2.保持镜台测微尺的干净。注意镜台测微尺刻度是用加拿大树胶和圆形盖波片封合的。当去除香柏油时，不宜用过多的二甲苯，以免使盖波片下的树胶溶解。
- 3.将目镜测微尺和镜台测微尺分别用擦镜纸擦拭后，放回盒内保存。

【实验报告及思考题】

1. 结果记录

- (1) 列表记录目镜测微尺校正结果。
- (2) 列表记录测量各种细胞大小的结果。

2. 思考题

- (1) 当接目镜不变，目镜测微尺也不变，只改变接物镜，目镜测微尺每格所量的镜台上物体的实际长度是否相同？为什么？

实验二 细胞膜的渗透性

【实验目的】

了解细胞膜的渗透性及各类物质进入细胞的速度。

【实验原理】

细胞膜具有选择透过性，直接调控物质进出细胞的过程，承担调节细胞渗透平衡和物质跨膜运输的功能。当红细胞置于不同等渗溶液中时，由于细胞膜对各种溶质的通透性不同，因此有的溶质分子不能透入，有的溶质分子可以透入，能透入的溶质分子的速度也不同。当溶质分子进入红细胞使细胞内溶质浓度增加时，会促使水分进入细胞内，并引起细胞体积的增大。当红细胞膨胀到一定程度时，细胞膜破裂，血红素溢出，即红细胞发生溶血。由于溶质透入细胞内的速度不同，因此溶血时间也不同。

溶血现象发生的快慢与进入细胞的物质的分子量大小有关。相对分子量大的物质进入细胞慢，发生溶血所需时间也长；相对分子量小的物质进入细胞快，发生溶血所需时间短。溶血现象发生的快慢与溶质的脂溶性大小有关。亲脂性化合物易溶于脂溶剂，在水中一般溶解度很小。一般碳链越长，脂溶性越大。

对于各种非电解质溶液，只要单位面积中所含的分子数相同，就具有相同的渗透压。对于相同摩尔浓度的电解质溶液与非电解质溶液，电解质溶液产生的渗透压要大很多，例如当NaCl与乙醇分子数相等时，NaCl产生的渗透压要大得多，是因为NaCl电解为 Na^+ 和 Cl^- ，使溶质的总摩尔数增加了。

在红细胞溶血实验中，把发生溶血前的溶液浓度近似认定为与红细胞等渗。

【材料、器具与试剂】

（一）材料：小鼠，兔，鸡，鸭等动物的血液。

（二）器具：普通光学显微镜，注射器，刀片，镊子，载玻片，盖玻片，吸管，小烧杯，试管，试管架，定时秒表，1.5 ml 离心管，量筒。

（三）试剂：0.17 M 氯化钠，0.17 M 氯化铵，0.17 M 醋酸铵，0.17 M 硝酸钠，0.12 M 硫酸钠；1.0 M 乙二醇，1.0 M 丙三醇（甘油），1.0 M 葡萄糖，1.0 M 甲醇，1.0 M 乙醇，1.0 M 丙醇。

【实验步骤】

1. 采用适当的方法取实验动物的新鲜血液（兔子用注射器耳静脉取血，小鼠用手术器械去除眼球采血，鸡、鸭可以宰杀取血）。



图2 细胞溶血前后对比

2. 取 100 ml 烧杯 1 只, 取血液 1 份, 加入 10 份 0.17 M 氯化钠, 混匀成为一种不透明的红色液体, 此即稀释的血液, 备用。

3. 取 1.5 ml EP 管 1 支, 加入 1.0 ml 蒸馏水, 然后再加入 0.1 ml 稀释的血液, 注意观察溶液的颜色变化, 溶液由不透明的红色变为红色透明, 红细胞发生破裂, 造成所有红细胞溶血, 使光线容易通过。显微镜下观察溶血前后红细胞的形态。

4. 观察电解质溶液进入细胞快慢对细胞溶血的影响: 取 1.5 ml EP 管 5 支, 分别加入 1.0 ml 的 0.17 M 氯化钠, 0.17 M 氯化铵, 0.17 M 醋酸铵, 0.17 M 硝酸钠, 0.12 M 硫酸钠溶液, 然后各加入 0.1 ml 的稀释血液, 混匀后观察是否有溶血现象发生, 如果发生, 记录各自的发生时间。

5. 观察分子量大小对膜通透性的影响: 取 1.5 ml EP 管 3 支, 分别加入 1.0 ml 的 1.0 M 乙二醇, 1.0 M 丙三醇, 1.0 M 葡萄糖溶液, 然后各加入 0.1 ml 的稀释血液, 混匀后观察是否有溶血现象发生, 如果发生, 记录各自的发生时间。

6. 观察脂溶性大小对膜通透性的影响: 取 1.5 ml EP 管 3 支, 分别加入 1.0 ml 的 1.0 M 甲醇, 1.0 M 乙醇, 1.0 M 丙醇溶液, 然后各加入 0.1 ml 的稀释血液, 混匀后观察是否有溶血现象发生, 如果发生, 记录各自的发生时间。

【实验结果与思考题】

1、将实验结果填入表中, 并分析结果:

试管编号	溶液种类	是否溶血	溶血所需时间	结果分析
1	0.17 M 氯化钠			
2	0.17 M 氯化铵			
3	0.17 M 醋酸铵			
4	0.17 M 硝酸钠			
5	0.12 M 硫酸钠			
6	1.0 M 乙二醇			
7	1.0 M 丙三醇			
8	1.0 M 葡萄糖			
9	1.0 M 甲醇			
10	1.0 M 乙醇			
11	1.0 M 丙醇			

2、推断下列溶液的溶血反应会如何。0.17 M 氯化钾、0.17 M 硝酸钾 0.12 M 氯化镁、0.12 M 氯化钙、0.10 M 硫酸钾、0.10 M 醋酸钾、0.10M 柠檬酸钠、1.0 M 甘露醇、1.0 M 蔗糖。

3、液的渗透压主要与哪些因素有关?对简单盐溶液如何粗略计算出其渗透压?

实验三 线粒体的活体染色与观察

【实验目的】

掌握动、植物细胞线粒体活体染色的原理和技术。

【实验原理】

活体染色是指对生活有机体的细胞或组织能着色，但又无毒害的一种染色方法。由于碱性染料的胶粒表面带有阳离子，酸性染料的胶粒表面带有阴离子，而被染部分本身具有阳离子或阴离子，因此它们彼此之间发生吸引作用，染料就被堆积下来，可以显示出活细胞内的某种天然结构存在的真实性，而不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学变化以引致细胞的死亡。活体染色技术可用来研究生活状态下的细胞结构和生理、病理状态。

活体染色可分为体内活染和体外活染两种类型。体内活染是将染料溶液以胶体状态注入动植物体内，染料的颗粒固定、聚集在细胞内的特殊部位，达到被识别观察的目的。体外活染又称为超活染色，该方法从活的动、植物体内分离出部分细胞或组织，以染料溶液侵染，染料被选择性地定位在活细胞的某种结构上而显色。

詹纳斯绿B(Janus Green B)是对线粒体具有专一性的碱性染料，毒性很小，能对动植物的细胞或组织在活体状态下进行无毒害的染色。詹纳斯绿B有两种状态，氧化态时呈蓝绿色，还原态时呈无色。詹纳斯绿B染色的原理是利用线粒体中的细胞色素氧化酶系的作用，使詹纳斯绿B保持氧化状态，呈蓝绿色，可被观察到，而在周围的细胞质中，詹纳斯绿B被还原成还原状态，呈无色，不能被观察到。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：洋葱鳞茎、人口腔上皮细胞，小麦或玉米根尖。

(二) 器具：普通光学显微镜、恒温水浴锅，天平，解剖盘、剪刀、镊子、解剖刀、吸管、载玻片、盖玻片、擦镜纸、吸水纸、牙签，1.5 ml离心管，量筒，烧杯。

(三) 试剂：

1.Ringer溶液：称取氯化钠8.50g，氯化钙0.03g，氯化钾0.25g，溶于蒸馏水，定容至100 ml。

2.1%詹纳斯绿B溶液：称取0.5g詹纳斯绿B溶于50 ml Ringer溶液中，稍加热(30~40℃)使之很快溶解，用滤纸过滤，即成1%溶液，储存备用。

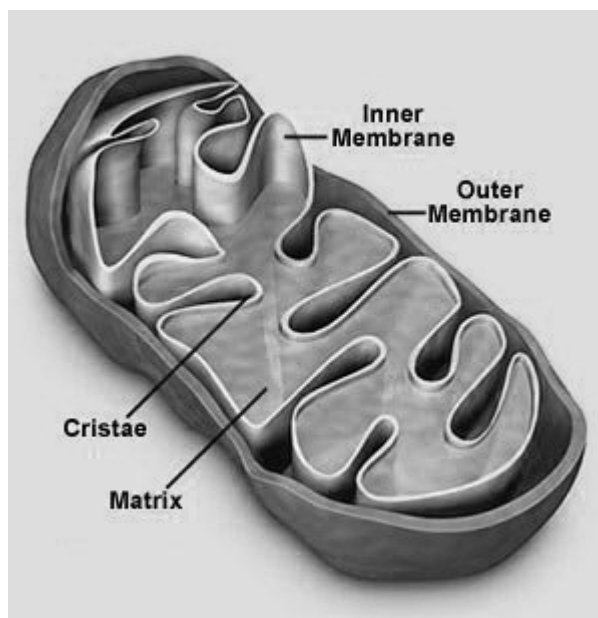


图3 线粒体结构模式图

3.1/5000詹纳斯绿B溶液：实验前，取1%詹纳斯绿B溶液1 ml，加入49 ml Ringer溶液混匀，即成1/5000詹纳斯绿B溶液，装入棕色瓶备用。溶液最好现用现配，以保持它的充分氧化能力。

【方法与步骤】

（一）人口腔上皮细胞的线粒体活体染色观察

- 1.取干净载玻片1张，滴一滴1/5000詹纳斯绿B溶液。
- 2.取一根灭菌的干净牙签，实验者用牙签宽头在自己口腔颊粘膜处稍用力刮取上皮细胞（注意：切勿用力过大过猛，以免将口腔刮伤），将牙签头上刮下的粘液状物放入载玻片上的染液滴中，可轻敲搅动几下，确保牙签上的上皮细胞进入染液滴中。
- 3.染色15 min左右。
- 4.盖上盖玻片，压片，用吸水纸吸去盖玻片周围多余水分，置于显微镜下观察。
- 5.先在低倍镜下选择平展的上皮细胞，在高倍镜或油镜下观察，可见口腔上皮细胞中的被染成蓝绿色的呈颗粒状或线条状物质，即为线粒体。在细胞核周围分布特别多。

（二）洋葱鳞茎表皮细胞的线粒体活体染色观察

- 1.取干净载玻片1张，滴一滴1/5000詹纳斯绿B溶液。
- 2.用镊子撕取洋葱鳞茎内表皮一小片，置于詹纳斯绿B染液中，染色10~15min。
- 3.染色时间到后，吸去多余染液，加一滴Ringer溶液，将洋葱内表皮展平，盖上盖玻片，压片，用吸水纸吸去盖玻片周围多余水分。
- 4.在显微镜下观察。高倍镜下，可见表皮细胞中央被一大液泡所占据，细胞核和细胞质被挤至旁边，线粒体染成蓝绿色，呈颗粒状或线条状，集中分布在靠近细胞膜的边缘。

【实验结果与思考题】

- 1.绘图表示线粒体在人口腔上皮细胞和洋葱鳞茎内表皮细胞中的形态和分布，注意比较两种不同来源细胞的大小比例。
- 2.简述线粒体詹纳斯绿B活体染色的原理。

实验四 线粒体的分离制备与观察

【实验目的】

- 1.了解差速离心技术的原理
- 2.掌握线粒体的差速离心分离技术。

【实验原理】

差速离心(differential centrifugation) 是利用不同物质颗粒沉降系数的差别, 由低速向高速离心时, 各种沉降系数不同的颗粒可先后分批沉淀下来, 达到分离的目的。沉降系数差别在一个或几个数量级的颗粒, 可以用差速离心法分离, 该方法简单, 但分辨率不高, 沉降系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开, 常用于其他分离手段之前的粗制品提取。差速离心用到的仪器为离心机, 一般认为, 转速为 10~25Kr/min 的离心机称为高速离心机; 转速低于 10Kr/min 的离心机称为低速离心机; 转速超过 25Kr/min 的离心机称为超速离心机。目前超速离心机的最高转速可达 100Kr/min, 离心力超过 500Kg。

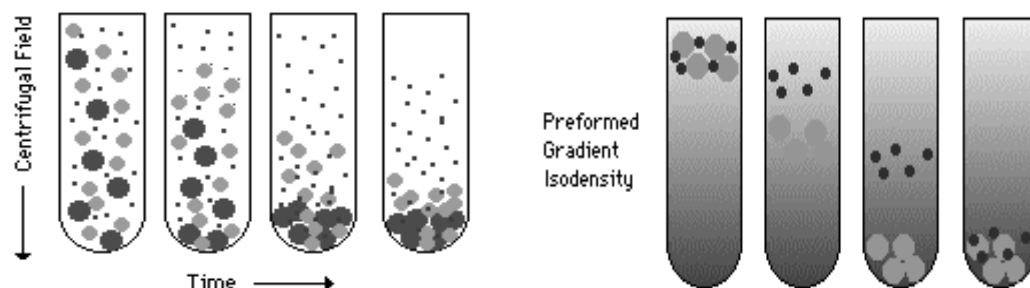


图 4 两种不同的离心分离方式。左图为差速离心, 右图为密度梯度离心

采用差速离心方法, 在密度均一的介质中由低速到高速逐级离心, 可用于分离不同大小的细胞和细胞器。在差速离心中细胞器沉降的顺序依次为: 核、线粒体、溶酶体与过氧化物酶体、内质网与高基体、最后为核蛋白体和大分子。通过差速离心可将细胞器初步分离, 常需进一步通过密度梯度离心再行分离纯化。

线粒体是真核细胞特有的进行能量转换的重要细胞器。将动植物组织制成匀浆, 在适当的悬浮介质中差速离心法可以分离细胞线粒体。悬浮介质通常采用缓冲的蔗糖溶液, 它较接近细胞质的分散相, 在一定程度上能保持细胞器的结构和酶的活性; pH7.2 的条件下, 亚细胞组分不容易聚集成团, 有利于分离。整个操作过程样品要保持在 4℃, 避免酶失活。

线粒体的检测鉴定采用詹纳斯绿 B(Janus green B)染色观察。线粒体内膜上分布有细胞色素氧化酶, 该酶使詹纳斯绿 B 染料保持在氧化状态呈现蓝绿色, 从而使线粒体显色, 而胞质中的染料被还原成无色。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料: 玉米黄化苗, 猪肝脏等。

(二) 器具：冷冻高速离心机，研钵，玻璃匀浆器，普通光学显微镜，天平，恒温水浴锅，解剖盘、剪刀、镊子、解剖刀、吸管、载玻片、盖玻片、擦镜纸、吸水纸、1.5 ml 离心管，量筒，烧杯。

(三) 试剂：

1.Ringer溶液：称取氯化钠8.50g，氯化钙0.03g，氯化钾0.25g，溶于蒸馏水，定容至100 ml。

2.1%詹纳斯绿B溶液：称取0.5g詹纳斯绿B溶于50 ml Ringer溶液中，稍加热(30~40℃)使之很快溶解，用滤纸过滤，即成1%溶液，储存备用。

3.1/5000詹纳斯绿B溶液：实验前，取1%詹纳斯绿B溶液1 ml，加入49 ml Ringer溶液混匀，即成1/5000詹纳斯绿B溶液，装入棕色瓶备用。溶液最好现用现配，以保持它的充分氧化能力。

4.1.0 M的Tris-HCl缓冲液 (pH7.4)：称量12.11g Tris置于烧杯中，加入约80 ml的去离子水，充分搅拌溶解。然后加入浓HCl约7.0 ml将pH调至7.4，将溶液定容至100 ml，高温高压灭菌后，室温保存备用。

5.0.5 M EDTA(pH 8.0)溶液：称取18.61 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，置于烧杯中，加入约80 ml的去离子水，充分搅拌。用NaOH调节pH值至8.0 (约20 g NaOH)，注意：pH值至8.0时，EDTA才能完全溶解。加去离子水将溶液定容至100 ml，高温高压灭菌，室温保存备用。

6.线粒体分离介质 (0.25 M蔗糖，50 mM Tris-HCl，3 mM EDTA，0.75 g/L BSA)：称取蔗糖85.5 g，取1.0 M的Tris-HCl缓冲液 (pH7.4) 50 ml，0.5 M EDTA(pH 8.0)溶液6 ml，加入0.75 g牛血清白蛋白 (BSA)，加入蒸馏水，溶解，定容至1 L，备用。

7.线粒体保存液 (0.3 M甘露醇，pH 7.4)：称取甘露醇5.46g，溶于蒸馏水中，调节pH至7.4，然后定容至100 ml，备用。

8.0.9%生理盐水：称取9克氯化钠，溶解在蒸馏水中，定容到1 L。

9.0.25M蔗糖溶液：称取蔗糖85.5 g，加入蒸馏水，溶解，定容至1 L。

10.20%次氯酸钠溶液。

【实验步骤】

一、动物肝脏线粒体的分离

1.制备肝细胞匀浆：取动物肝脏，迅速用生理盐水洗净血水，用滤纸吸干水分，称取肝组织 1 g，剪碎；用预冷的 0.25M蔗糖溶液洗涤数次。然后按每克肝加 9 ml预冷的 0.25M蔗糖溶液的量，分数次添加蔗糖溶液，在 0℃~4℃冰浴中用玻璃匀浆器将肝组织制成匀浆。

2. 取匀浆液 1.5 ml 于 1.5 ml 的 EP 管中，置于冷冻离心机中，以 2500 rpm 离心 10 min。

3.取 1.0 ml 上清转入新 EP 管中，置于冷冻离心机中，以 10 000 rpm 离心 10 min，弃上清，得到沉淀即为线粒体。

4.加入预冷的 0.25M 蔗糖溶液 1.5 ml，摇匀洗涤后，10 000 rpm 离心 5 min，弃上清。重复两次。

5.最后得到的线粒体沉淀取少量，点在载玻片上，滴加 1 滴 1/5000 詹纳斯绿 B 溶液，染色 10 min。

6.加盖玻片，压片，用吸水纸吸去盖玻片周围多余水分。光学显微镜下观察，可见线粒体被染成蓝绿色，呈球形、小棒状或哑铃状。

注意事项：如果使用非冷冻控温的离心机，应注意使样品保持冷冻；尽可能充分破碎组织，缩短匀浆时间，整个分离过程不宜过长。

二、植物线粒体的分离制备

1. 玉米种子用 20%次氯酸钠溶液浸泡 10 min 消毒，清水冲洗 30min，再用清水浸泡 12 hr 催芽。然后将种子均匀铺放在发芽盒中，覆盖一层湿润的沙子，保持湿度，置于温箱 28℃暗培养 3~5 d，得到黄化苗。

2. 取黄化苗样品 1 g，加入 3 ml 预冷的线粒体分离介质，在瓷研钵内快速研磨匀浆。

3. 取匀浆液 1.5 ml 于 1.5 ml 的 EP 管中，置于冷冻离心机中，以 2500 rpm 离心 10 min。

4. 取 1.0 ml 上清转入新 EP 管中，置于冷冻离心机中，以 10 000 rpm 离心 10 min，弃上清，得到沉淀即为线粒体。

5. 加入预冷的线粒体分离介质 1.5 ml，摇匀洗涤后，10 000 rpm 离心 5 min，弃上清。

6. 将得到的线粒体沉淀取少量，点在载玻片上，滴加 1 滴 1/5000 詹纳斯绿 B 溶液，染色 10 min。

7. 加盖玻片，压片，用吸水纸吸去盖玻片周围多余水分。光学显微镜下观察，可见线粒体被染成蓝绿色，呈圆形颗粒。

注意事项：如果使用非冷冻控温的离心机，应注意使样品保持冷冻；尽可能充分破碎组织，缩短匀浆时间，整个分离过程不宜过长。

【实验结果与思考题】

1. 描述两种线粒体装片的观察结果，根据你的实验结果，你认为所分离的线粒体的纯度如何？

2. 线粒体提取分离过程中，为什么要在 0~4℃进行？

3. 要获得高活性的线粒体，在线粒体提取、分离和活性鉴定的过程中需注意哪些问题？

实验五 植物液泡的活体染色与观察

【实验目的】

掌握植物液泡活体染色的原理和技术。

【实验原理】

活体染色是指对生活有机体的细胞或组织能着色，但又无毒害的一种染色方法。由于碱性染料的胶粒表面带有阳离子，酸性染料的胶粒表面带有阴离子，而被染部分本身具有阳离子或阴离子，因此它们彼此之间发生吸引作用，染料就被堆积下来，可以显示出活细胞内的某种天然结构存在的真实性，而不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学变化以引致细胞的死亡。

活体染色可分为体内活染和体外活染两种类型。体内活染是将染料溶液以胶体状态注入动植物体内，染料的颗粒固定、聚集在细胞内的特殊部位，达到被识别观察的目的。体外活染又称为超活染色，该方法从活的动、植物体内分离出部分细胞或组织，以染料溶液侵染，染料被选择性地定位在活细胞的某种结构上而显色。活体染色技术可用来研究生活状态下的细胞结构和生理、病理状态。

液泡(vacuole) 是植物细胞质中的泡状结构，是植物细胞中特有的细胞器，在成熟的活的植物细胞中经常都有一个大的充满液体的中央液泡，可占据整个细胞体积的90%，是在细胞生长和发育过程中由小的液泡融合而成的。液泡的表面有液泡膜，液泡内有细胞液，含有无机盐、氨基酸、糖类以及各种色素等代谢物，甚至还含有有毒化合物，并处于高渗状态。因此，它对细胞内的环境起着重要的调节作用，可以使细胞保持一定的渗透压，保持膨胀的状态。

中性红(neutral red)是一种弱碱性pH指示剂，变色范围在pH6.4~8.0之间(由红变黄)。植物的活细胞能大量吸收中性红并向液泡中转移，由于液泡一般情况下呈酸性反应，进入液泡的中性红可解离出大量阳离子而呈现樱桃红色，原生质和细胞壁一般不着色；死细胞由于原生质变性凝固，液泡失去功能，用中性红染色时，中性红不能进入液泡，中性红的阳离子反而与带有一定负电荷的原生质及细胞核结合，而使原生质与细胞核染色。因此，中性红是液泡的特殊染色剂，只将液泡染成红色，在细胞处于生活状态时，细胞质和细胞核不被中性红染色。

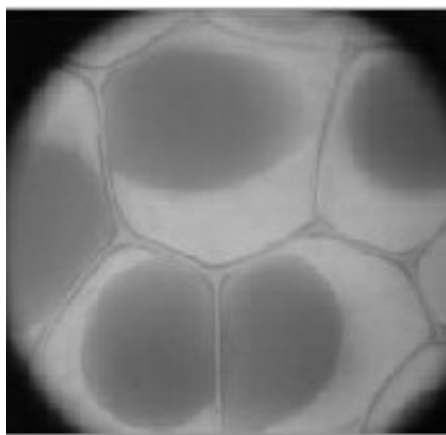


图5 液泡的中性红染色

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：洋葱鳞茎，小麦根尖，玉米根尖，大豆根尖。

(二) 器具：普通光学显微镜、恒温水浴锅，天平，解剖盘、剪刀、镊子、解剖刀、吸管、载玻片、盖玻片、擦镜纸、吸水纸，量筒，烧杯。

(三) 试剂:

1. Ringer溶液: 氯化钠 8.50g, 氯化钙 0.03g, 氯化钾 0.25g, 蒸馏水100 ml溶解定容。
2. 1%中性红溶液: 称取0.5 g中性红溶于50 ml Ringer溶液, 稍加热(30~40℃)使之很快溶解, 用滤纸过滤, 装入棕色瓶于暗处保存, 否则易氧化沉淀, 失去染色能力。
3. 1/3000中性红溶液: 临用前, 取已配制的1%中性红溶液2 ml, 加入58 ml Ringer溶液混匀, 装入棕色瓶备用。

【实验步骤】

1. 材料培养: 实验前, 把小麦、玉米或者大豆的种子用清水浸泡12 hr, 然后放在含有湿润沙子的盒子中培养, 使其发芽生根。待根长到2 cm以上时, 可用于实验。
2. 取培养得到的根系的根尖(约1~2 cm), 用刀片小心纵切一下。
3. 将纵切后的根尖放到干净的载玻片上, 滴1滴1/3000中性红溶液, 染色5~10 min。
4. 用吸水纸吸去多余染液, 滴1滴Ringer溶液, 盖上盖玻片, 并用镊子轻压盖玻片, 将根尖压扁铺展, 使其便于观察。
5. 置显微镜下观察。在高倍镜下, 首先观察根尖生长点的细胞, 可见细胞质中有很多大小不等的被染成玫瑰红色的圆形小泡, 这是初生的幼小液泡。然后由生长点向伸长区观察, 在一些已分化长大的细胞内, 液泡的体积增大, 数目变少, 染色较浅。最后观察成熟区细胞, 一般只有一个淡红色的巨大液泡, 占据细胞的绝大部分体积, 将细胞核挤到细胞一侧贴近细胞壁处。

【实验结果与思考题】

1. 绘图表示根尖不同部位液泡的形态和分布。
2. 简述液泡中性红活体染色的原理。
3. 小麦或黄豆根尖经中性红染色, 为什么看到生长点的细胞中液泡多, 而且染色深, 伸长区细胞中液泡数量变少, 染色浅?

实验六 叶绿体的分离与荧光观察

【实验目的】

- 1.了解叶绿体分离的一般原理和方法。
- 2.熟悉应用荧光显微镜观察叶绿体的荧光现象。

【实验原理】

差速离心(differential centrifugation) 是利用不同物质颗粒沉降系数的差别, 由低速向高速离心时, 各种沉降系数不同的颗粒可先后分批沉淀下来, 达到分离的目的。颗粒的沉降系数取决于颗粒的大小、形状和密度, 也同离心力以及悬浮介质的粘度有关。沉降系数差别在一个或几个数量级的颗粒, 可以用差速离心法分离, 该方法简单, 但分辨率不高, 沉降系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开, 常用于其他分离手段之前的粗制品提取。采用差速离心方法, 在密度均一的介质中由低速到高速逐级离心, 可用于分离不同大小的细胞和细胞器。在差速离心中细胞器沉降的顺序依次为: 核、叶绿体、线粒体、溶酶体与过氧化物酶体、内质网与高基体、最后为核蛋白体和大分子。通过差速离心可对叶绿体进行分离制备。

叶绿体(chloroplast)是绿色植物细胞所特有的能量转换细胞器。一般呈椭球形, 长径5~10 μm , 短径2~4 μm , 厚2~3 μm 。有双层被膜与胞质分开, 内有片层膜, 含叶绿素, 光合作用就在片层膜上进行。高等植物的叶肉细胞一般含50~200个叶绿体, 可占细胞质的40%, 叶绿体的数目因物种细胞类型, 生态环境, 生理状态而有所不同。叶绿体由叶绿体外被(chloroplast envelope)、类囊体(thylakoid)和基质(stroma)3部分组成。利用低速离心机可以分离叶绿体, 其分离在等渗溶液(0.35M 氯化钠或0.4M 蔗糖溶液)中进行, 目的是防止渗透压的改变引起叶绿体的损伤。

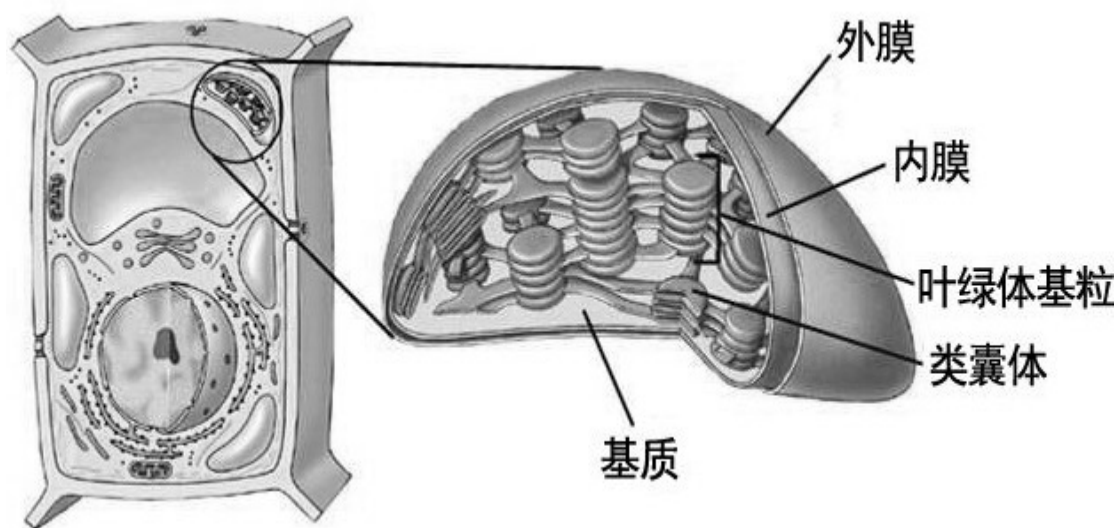


图6 叶绿体的结构模式图

荧光显微镜是一种较为常用的光学显微镜, 其基本原理是利用一定波长的激发光对样品进行激发, 使之产生一定波长的荧光, 从而用于对样品结构或其组分进行定性、定位、定

量观察检测。荧光显微镜的基本构造是由普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等)的基础上组成的。荧光是某些物质在一定短波长的光(如紫外光)的照射下吸收光能进入激发态,从激发态回到基态时,放射出的比照射光波长更长的光(如可见光)。荧光物质都是吸收短波长的光而发出较长波长的光,比如 DAPI 吸收紫色光发出蓝色荧光,绿色荧光蛋白、FITC 吸收蓝色光发出绿色荧光, CY3、PI 吸收绿色光发出红色荧光, CY5 吸收红色光发出波长为 670 纳米的红外线。 荧光必须是在有激发光照射的情况下才会有,若停止供能,荧光现象立即停止。荧光可分为直接荧光和间接荧光两种。直接荧光:在生物的某些组织中,经紫外线照射后能直接发射出荧光,又称为自发荧光,如植物组织中的叶绿素,经紫外线照射后,即可发出红色荧光。间接荧光:有些生物组织经紫外线照射后,并不能发出荧光,但是当它吸收荧光染料后也可以产生荧光,又称为次生荧光,如吖啶橙, DAPI。

吖啶橙(Acridine Orange, AO)是一种荧光色素,其激发滤光片波长 488nm,阻断滤光片波长 515nm。它与细胞中 DNA 和 RNA 结合量存在差别,可发出不同颜色的荧光(即着色特异性),这是由于 DNA 是个高度聚合物,吸收荧光物质的位置较少,发绿色荧光,而 RNA 聚合度低,能和荧光物质结合的位置多,故发红色荧光。用 0.01%吖啶橙荧光染料对叶绿体进行染色,于荧光显微镜下观察,可观察到叶绿体发橙红色荧光。

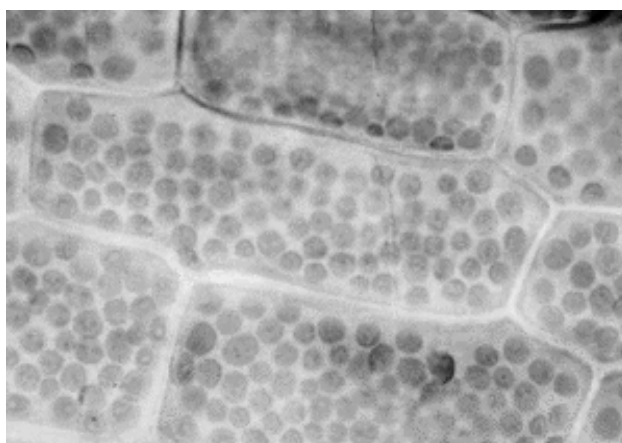


图 7 普通光学显微镜下观察到的叶绿体

【材料、器具与试剂】

(一) 材料:菠菜叶片

(二) 器具:普通离心机,组织捣碎机,天平,荧光显微镜,普通光学显微镜,载玻片,盖玻片,镊子,培养皿,滤纸,试管,试管架,滴管,无荧光载片,移液器,1.5 ml 离心管,量筒,烧杯。

(三) 试剂:

1. 蒸馏水
2. 0.35 M 氯化钠溶液:取 20.48 g 氯化钠,用蒸馏水溶解,定容至 1 L。
3. 0.1 %吖啶橙(acridine orange):称取 0.1g吖啶橙,加蒸馏水 100 ml溶解,作为母液贮棕色瓶中,放冰箱备用。
4. 0.01%吖啶橙(acridine orange):临用前,取 1 ml 0.1 %吖啶橙母液,加 9 ml蒸馏水,混匀。

【实验步骤】

一、叶绿体的徒手切片观察

1. 取新鲜的菠菜叶片，用刀片横向切削一个薄片，置于干净的载玻片上。
2. 滴加 1 滴 0.35 M 氯化钠溶液，加盖玻片，压片，使细胞平展。
3. 置普通光学显微镜下观察，可以看到 3 种类型的细胞：边缘为锯齿形的鳞片状表皮细胞；构成气孔的成对存在的肾形保卫细胞；排成栅栏状的长形和椭圆形的叶肉细胞，内含叶绿体，呈绿色橄榄形。在高倍镜下可看到叶绿体中绿色的基粒。
4. 在荧光显微镜下观察，选用 B(blue)激发滤片、B 双色镜和 O(orange)阻断滤片，可观察到叶绿体发出火红色荧光，气孔发出绿色荧光，保卫细胞的叶绿体呈火红色，围绕气孔排成一圈。
5. 揭下盖玻片，滴加 1 滴 0.01% 吖啶橙染液，染色 2 min 后，加盖玻片，吸去多余溶液，压片，置荧光显微镜下观察。可观察到叶绿体发出桔红色荧光，细胞核则发绿色荧光。

二、叶绿体的分离提取与观察

1. 取新鲜的菠菜叶片，洗净后吸干水分，去除叶梗及粗脉，称取 1 g 样品，置于研钵中，加入 0.35 M 氯化钠溶液 5 ml，研磨匀浆。
2. 取 1.5 ml 匀浆液于 1.5 ml 离心管中，在离心机中 1000 rpm 离心 5 min。
3. 将离心得到的上清液转入新的 1.5 ml 离心管中，在离心机中 3000 rpm 离心 5 min。
4. 弃去上清液，得到沉淀即为叶绿体（混有部分细胞核）。
5. 沉淀用少量 0.35 M 氯化钠溶液悬浮。
6. 取叶绿体悬液 1 滴置于载玻片上，加盖玻片，压片后用普通光学显微镜观察。
7. 将叶绿体悬液滴在无荧光的载玻片上，盖上无荧光的盖玻片，用荧光显微镜观察。
8. 将叶绿体悬液滴在无荧光的载玻片上，再滴加 1 滴 0.01% 吖啶橙荧光染料，染色 2 min，盖上无荧光的盖玻片，用荧光显微镜观察。

【实验结果与思考题】

1. 绘图表示在普通光学显微镜下，徒手切片和分离叶绿体观察的情况。
2. 记录荧光显微镜下观察的叶绿体自发荧光和次生荧光现象。
3. 分离叶绿体实验的原理是什么？操作过程中应注意什么？
4. 普通光学显微镜和荧光显微镜的原理有何异同点？

实验七 细胞内过氧化物酶的观察

【实验目的】

掌握细胞中过氧化物酶类的鉴定方法。

【实验原理】

过氧化物酶类广泛存在于植物体中，主要包括过氧化物酶和过氧化氢酶。过氧化物酶是活性较高的一种酶，它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系。在植物生长发育过程中它的活性不断发生变化，一般老化组织中活性较高，幼嫩组织中活性较弱。细胞中存在的过氧化物酶能把许多胺类物质氧化成有色化合物，联苯胺可被细胞中的过氧化物酶氧化成蓝色或者棕色络合物(蓝色物质为中间产物联苯胺蓝，很不稳定，可转变为棕色的联苯胺棕)，从而显示出细胞内过氧化物酶的分布。过氧化物酶可作为组织老化的一种生理指标。

细胞代谢过程会产生对机体有害的过氧化氢(H_2O_2)，为了解除过氧化氢对细胞的毒害，细胞中的过氧化氢酶将其分解为水和氧气，对机体起保护作用。通过植物块茎与过氧化氢相遇后发生的反应可间接证实该酶的存在。

过氧化物酶可以催化过氧化氢氧化酚类的反应，产物为醌类化合物，此化合物进一步缩合与其他分子缩合，产生颜色较深的化合物。以邻甲氧基苯酚（即愈创木酚）为过氧化物酶的底物，在过氧化物酶存在下， H_2O_2 可将邻甲氧基苯酚氧化成红棕色的4-邻甲氧基苯酚，红棕色的物质可用分光光度计在470nm处测定其吸光度，即可求出该酶的活性。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：马铃薯、洋葱根尖，玉米或水稻根系。

(二) 器具：光学显微镜、解剖盘、剪刀、镊子、刀片、牙签、载玻片、盖玻片、吸水纸、量筒、烧杯、分光光度计、研钵、秒表、天平。

(三) 试剂：

1. 0.1%钼酸铵：取0.1 g钼酸铵溶于100 ml蒸馏水中。
2. 1%联苯胺：取1.0 g联苯胺溶于100 ml蒸馏水中。
3. 0.9%生理盐水：取NaCl 9.0 g溶于1000 ml蒸馏水中。
4. 3%过氧化氢溶液：取过氧化氢溶液3.0 ml，加入到97.0 ml蒸馏水中。
5. 0.1M Tris-HCl缓冲液 (pH8.5)：取12.114g三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，加水稀释，用HCl调pH至8.5，后定容1 L。
6. 0.2 M NaH_2PO_4 贮备液：称取27.8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ，溶于蒸馏水中，定容至1 L。
7. 0.2 M Na_2HPO_4 贮备液：称取53.65 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 或71.7 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ，溶于蒸馏水中，定容至1 L。
8. 0.2 M磷酸缓冲液 (pH6.0)：分别取0.2 M NaH_2PO_4 贮备液87.7 ml与0.2 M Na_2HPO_4 贮备液12.3 ml充分混匀并稀释至200 ml。
9. 反应混合液：取0.2 M磷酸缓冲液 (pH6.0) 500 ml，过氧化氢0.28 ml，愈创木酚0.19 ml混合。

【实验步骤】

一、洋葱根尖细胞过氧化物酶(POD)的显示

1. 取新鲜洋葱根尖（1~2cm），用刀片纵向切开。
2. 将切开的根尖置于载玻片上，滴加1滴0.1%钼酸胺，放置5 min。
3. 滴加1滴1%联苯胺溶液，用镊子轻搅几下，放置5 min左右，待其出现蓝色。
4. 用吸水纸吸去多余溶液，用生理盐水冲洗1次。
5. 加盖玻片，压片展开，显微镜下观察，可见细胞内部分区域被染成蓝色，即为过氧化物酶存在的部位。

二、马铃薯细胞中过氧化氢酶（CAT）的间接显示

1. 将马铃薯洗净，用刀片切成小薄片，置于载玻片上。
2. 将3%的过氧化氢溶液滴加在马铃薯薄片上，可见组织四周出现大量的气泡，提示植物细胞中有过氧化氢酶存在，气泡为过氧化氢水解产生的氧气。

三、过氧化物酶(POD)活性的测定

1. 酶液提取：取不同玉米或水稻根系（根系表面水分吸干）1 g，剪碎置于研钵中，加5 ml 0.1 M Tris-HCl缓冲液（pH8.5），研磨匀浆。
2. 取匀浆液1.5 ml，以4 000 rpm离心5 min，取出上清液转入新管，保存在冰箱（或冰浴）备用。
3. 取光径1cm比色杯2个，向其中之一加入上述酶液1 ml（如酶活性过高可稀释之），再加入反应混合液3 ml，立即开启秒表记录时间；而向另一比色杯中加入0.2 M磷酸缓冲液（pH6.0），作为零对照。
4. 反应时间到达5 min时，用分光光度计在470nm波长下测定吸光值。
5. 结果计算：以每min吸光度变化（以每minOD_{470nm}变化0.01为1个活力单位）表示酶活性大小（单位：U/g鲜重）。

【实验结果与思考题】

1. 简述联苯胺反应显示过氧化物酶的原理。
2. 简述间接显示过氧化氢酶的原理。

实验八 细胞内含物的观察

【实验目的】

1. 掌握植物细胞中蛋白质贮藏颗粒的测定方法。
2. 掌握细胞碳水化合物的鉴定方法。
3. 掌握细胞中脂肪颗粒的鉴定方法。
4. 掌握细胞中多糖的鉴定方法。

【实验原理】

细胞中除了含有细胞核、线粒体、高尔基体、内质网、叶绿体、核糖体等细胞器外，还含有大量的蛋白质、碳水化合物、脂肪等内含物，对这些内含物进行鉴定和检测，是细胞生物学的重要研究内容。

蛋白质的鉴定原理：蛋白质是由氨基酸组成的结构复杂的高分子，测试蛋白质常用的方法是用碘—碘化钾溶液，但浓度较大效果才好。当碘液与细胞中的蛋白质作用时，呈黄色反应。在显微镜下观察时，可见黄色的颗粒状。注意在进行这种蛋白质鉴定工作之前，先在植物切片材料上滴加 95%的酒精，首先把材料中的脂肪溶解掉，以保证蛋白质颜色反应的正确性。

淀粉的鉴定原理：糖类是生物机体生命活动能量的主要来源，淀粉是植物细胞内储藏能量的多糖物质。淀粉在不同植物细胞中形成各种不同形状的颗粒，淀粉有直链和支链之分。当稀释的碘—碘化钾溶液与淀粉作用时，形成复合物—碘化淀粉，呈特殊的蓝色反应，所以用碘液测试淀粉是最常用的方法。但需注意如果碘液过浓，会使碘化淀粉变黑，反而不利于淀粉粒轮纹及脐点的观察。

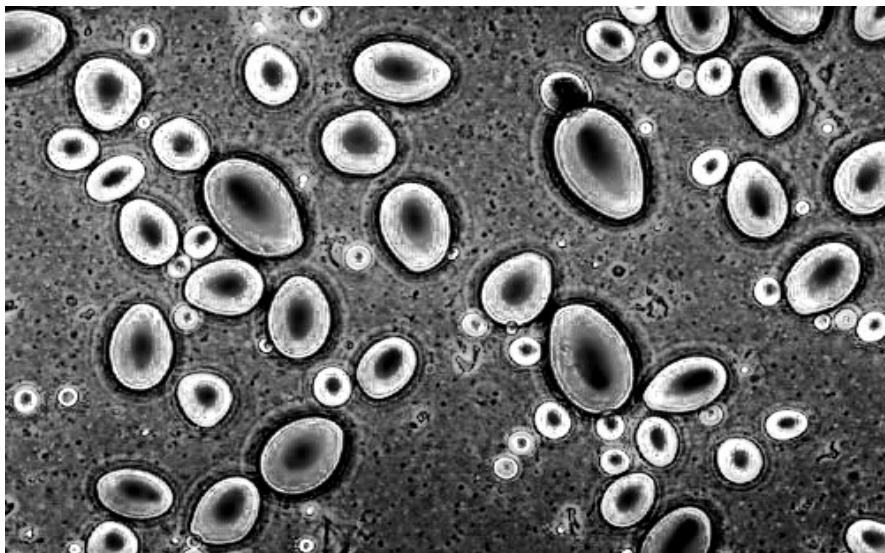


图8 显微镜下的马铃薯淀粉颗粒

脂肪和油滴的鉴定原理：脂肪和油滴也是植物细胞贮藏的主要营养物质之一。脂肪在常温下为固体形态，油滴则呈液体状态，均不溶于水。常用的显示脂肪的显微化学方法是苏丹III的酒精溶液染色，呈橘红色（但近年已多用苏丹IV的丙酮染液代替，其染色效果比前者稍

红和明显)。在鉴定过程中,为了效果明显,可稍加热以促进其反应。

细胞内多糖的鉴定是利用过碘酸希夫反应(period acid Schiff reaction),简称 PAS 反应。该方法最常用于显示细胞、组织内的多糖和蛋白多糖,其基本原理是:糖被强氧化剂过碘酸(HIO_4)氧化后,使多糖释放出醛基,醛基与与 Schiff 试剂中的无色品红亚硫酸复合物结合,形成紫红色反应产物,PAS 反应阳性部位即表示多糖的存在。因此在有多糖的部位,就会呈现除紫红色阳性反应。

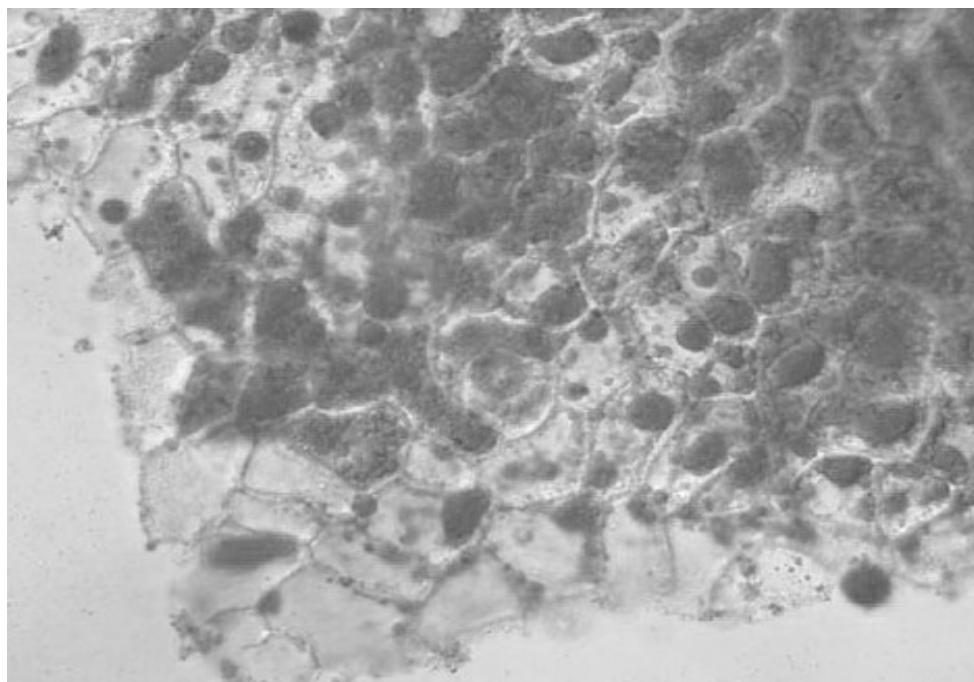


图9 油滴被苏丹 III 染色后的效果

【材料、器具与试剂】

(一) 材料:大豆的种子,马铃薯,花生种子

(二) 器具:普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、滴管、吸水纸、毛笔、刀片、吸水纸、量筒、烧杯、秒表、天平。

(三) 试剂:

1. 碘-碘化钾试剂:碘化钾3.0 g,加100 ml蒸馏水,加热溶解后,加入1.0 g碘,再稀释至300 ml,放棕色瓶中保存。

2. 苏丹III溶液:称取0.1 g苏丹III,溶解在20 ml 95%酒精中。可用来染木栓、角质层和脂肪。由于脂肪能溶解在酒精中,因此,用苏丹III溶液染脂肪时不能超过10 min。

3. 革兰氏碘液:称取1.0 g碘化钾,溶于50 ml蒸馏水中,再加0.5 g碘,使之溶解,最后用蒸馏水稀释定容至150 ml,于棕色瓶中保存。

4. 70%乙醇。

5. 高碘酸溶液:称取高碘酸($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.80 g,乙酸钠0.27 g,溶于70%乙醇中,定容至100 ml,保存备用。

6. 1.0 M盐酸溶液：量取82.5 ml浓盐酸，加蒸馏水稀释至1 L。

7. Schiff试剂：将碱性品红0.50克加入100 ml沸水，持续煮沸5min，并随时搅拌，待冷却到50℃时过滤到棕色瓶中，加1.0 M的盐酸10 ml，冷却至25℃时加入0.50 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ （偏重亚硫酸钠），此时需充分的振荡，在黑暗处静置24 hr。使其颜色变成呈淡黄色，加0.50 g活性炭剧烈振荡1min。过滤后即得Schiff试剂，装入棕色瓶中，外包黑纸，放到4℃冰箱避光保存。使用前升至室温。注意随时盖紧瓶口，不要过长时间暴露在空气中，并用黑纸或暗盒避光，以避免氧化变成红色。如变成红色即失去染色能力。

8. 亚硫酸水溶液：称取1.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ （偏重亚硫酸钠），溶于100 ml蒸馏水中，再加入10 ml 1.0 M盐酸，定容至200 ml，现用现配。

【实验步骤】

一、植物细胞中蛋白质贮藏颗粒的测定

1. 实验前4 hr，将大豆种子浸泡在清水中，使其吸水膨胀变软。
2. 取浸软的大豆种子，剥去种皮，分开子叶，用刀片作横切片，越薄越好。
3. 将切片放在载玻片上，滴加碘—碘化钾溶液1~2滴，染色5 min。
4. 盖上盖玻片，压片，吸干多余水分。
5. 置显微镜下观察：蛋白质染成黄褐色(蛋白质与碘作用呈现黄色反应)，淀粉染成蓝色。

二、植物细胞中碳水化合物的测定

1. 取一块马铃薯，洗净，用徒手切片法，切成薄片，越薄越好。
2. 取干净载玻片1张，滴1滴蒸馏水，将马铃薯薄片放于载玻片上的水滴中，加盖玻片，压片后观察，先观察一下淀粉粒的形状及在细胞内的分布
3. 移去盖玻片，用吸管吸取革兰氏碘液，加1滴于马铃薯薄片上，染色5 min。
4. 盖上盖玻片，压片，显微镜下观察。
5. 低倍镜下所见多角形的薄壁细胞中有许多椭圆形蓝色颗粒，即淀粉粒，染色浅的颗粒可以观察到淀粉颗粒的螺旋。

三、植物细胞中脂肪颗粒的显示

1. 实验前，先将大豆种子浸泡在清水中，使其吸水膨胀变软。
2. 取浸软的大豆种子，剥去种皮，分开子叶，用刀片作横切片，越薄越好（也可用花生种子）。
3. 从中挑选最薄的一片，用毛笔移到干净的载玻片上，滴1滴蒸馏水，倾斜地盖上盖玻片，压片。
4. 在显微镜下观察，可看到子叶的细胞里有很多油滴。在标本的边缘，还可以见到从破碎的细胞中散出的油滴。
5. 在盖玻片的一边加1滴苏丹 III 溶液，在盖玻片的另一边用吸水纸吸水，让苏丹 III 溶液迅速扩散进去，染色5 min。

6. 染色后再用显微观察，油滴被染上橙黄色。
7. 脂肪染色后必须马上观察，不能超过10 min，否则，油滴将陆续破碎。这是因为苏丹III溶液中含有酒精，而脂肪能溶解在酒精中。

四、细胞中多糖的显示

1. 取一块马铃薯，洗净，用徒手切片法，切成薄片，越薄越好。
2. 取干净载玻片1张，将马铃薯切片放在载玻片上，滴1滴过碘酸溶液，浸泡5~10 min。
3. 用吸水纸吸干过碘酸溶液，滴加70%乙醇溶液，浸泡2 min。
4. 用吸水纸吸干70%乙醇溶液，滴加Schiff试剂染色15 min。
5. 用亚硫酸水溶液洗3次，每次1min。
6. 蒸馏水洗冲洗3次。
7. 盖上盖玻片，压片，显微镜下观察。
8. 可以观察到细胞中被染成紫红色的部分，为多糖分布的位置。

【实验结果与思考题】

1. 绘图描述细胞内含物观察实验的结果。
2. 简述细胞内蛋白质、淀粉及多糖鉴定实验的原理。
3. 请设法检测花生子叶中是否有淀粉颗粒？或马铃薯中是否有脂滴？

实验九 细胞骨架的光学显微镜观察

【实验目的】

1. 掌握用光学显微镜观察植物细胞骨架的原理及方法
2. 观察光学显微镜下细胞骨架的网状结构。
3. 掌握观察动物细胞和植物细胞内微丝的考马斯亮蓝 R250 染色法。

【实验原理】

细胞骨架(cytoskeleton)是指真核细胞中的蛋白纤维网架体系。广义的细胞骨架包括细胞核骨架(核内骨架、染色体骨架和核纤层)、细胞质骨架(微丝、微管、中间纤维)、细胞膜骨架、细胞外基质。狭义的细胞骨架仅指细胞质骨架,按组成成分和形态结构的不同可分为微管(microtubule, 简称MT, 直径 25 nm)、微丝(microfilament, 简称MF, 直径 7 nm)和中间纤维(intermediated filament, 简称IF, 直径 10 nm)。这些不同的纤维是由不同的蛋白质亚单位(骨架蛋白)以特定的方式聚合形成的。细胞骨架在细胞内形成支持网络系统,对于维持细胞的形状、细胞的运动、细胞内物质的运输、染色体的分离和细胞分裂等起着重要的作用,近来研究发现,细胞骨架还参与细胞能量转换,信息传递,基因表达等。

微丝是肌动蛋白构成的纤维,称作 F-actin,单根微丝直径约 7 nm,在光学显微镜下看不到。由微丝平行排列组成的纤维束,在动物细胞里称作"应力纤维"(stress fiber)。一般当细胞充分铺展时,经考马斯亮蓝 R250 染色,可看到沿细胞长轴伸展的粗大纤维束,此即应力纤维。应力纤维上还周期性地分布着微丝结合蛋白,包括 α -辅肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球蛋白、类肌钙蛋白等。应力纤维的端部连接着质膜上的粘着斑,与加强细胞对基质的附着、铺展及维持细胞特定形状有关。非肌细胞中的微丝是动态结构,肌动蛋白单体(G-actin)与纤维(F-actin)在一定条件下互相转化。

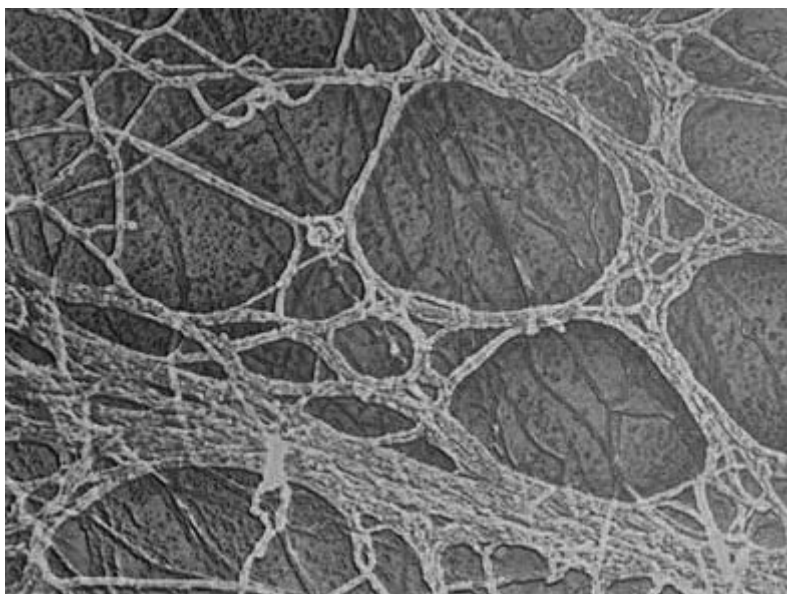


图 10 显微镜下的细胞骨架

当用适当浓度的 TritonX-100 处理细胞时，可将细胞膜中和细胞质中的蛋白质和全部脂质被溶解抽提，但细胞骨架系统的蛋白质不受破坏而被保存完好，经用戊二醛固定，考马斯亮蓝 R250(Coomassie brilliant blue R250)染色后，可在光学显微镜下观察，可见到由微丝组成的微丝束为网状结构，就是细胞骨架。考马斯亮蓝 R250(Coomassie brilliant blue R250)是一种蛋白质染料，

观察和研究细胞骨架可用光镜、电镜、间接免疫荧光技术、细胞化学技术等方法。本实验中M-缓冲液提供的离子条件可使F-actin稳定，考马斯亮蓝R250是一种蛋白质染料，可以染各种蛋白，并非特异染微丝，实验中用1% Triton X-100抽提掉胞质中除骨架蛋白以外的其他蛋白质，能清晰地显示微丝束的结构。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：洋葱鳞茎，动物小肠组织

(二) 器具：光学显微镜，50 ml 烧杯，镊子，滴管，载玻片，盖玻片、温箱，天平，刀片，量筒，吸水纸，试剂瓶。

(三) 试剂：

1. M缓冲液(pH7.2)：称取咪唑 3.40 g，KCl 3.71 g， $MgCl_2 \cdot H_2O$ 101.7 mg，EGTA(乙二醇双醚四乙酸)380.4 mg，EDTA(乙二胺四乙酸)29.2 mg，巯基乙醇 0.1 ml、甘油 292.0 ml，加蒸馏水充分溶解，用 1.0 M 的盐酸调节pH值至 7.2，最后定容至 1 L。

2. 0.2%考马斯亮蓝 R250 染色液：称取考马斯亮蓝 R250 0.4 g，溶于 93.0 ml 甲醇中，加冰醋酸 14.0 ml，最后加蒸馏水定容至 200 ml。

3. 1% Triton X-100：取 Triton X-100 2.0 ml，与 198.0 ml 的 M 缓冲液混匀。

4. 0.2 M NaH_2PO_4 贮备液：称取 27.8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ，溶于蒸馏水中，定容至 1 L。

5. 0.2 M Na_2HPO_4 贮备液：称取 53.65 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 或 71.7 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ，溶于蒸馏水中，定容至 1 L。

6. 10.0 mM的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH7.2)：在 800 ml蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 ，用HCl调节溶液的pH值至 7.4 加水定容至 1L，高压蒸气灭菌，保存备用。

7. 3%戊二醛：取 25%的戊二醛 24 ml，加入 10.0 mM 的 PBS 溶液 176 ml。

8. 中性树胶。

【实验步骤】

一、植物细胞骨架的显示与观察

1. 用镊子撕取洋葱鳞茎内表皮 1 片，置于 1.5 ml 离心管中，加入 10.0 mM 的 pH7.2 的 PBS 缓冲液 1.5 ml，使其浸在溶液中，处理 5~10 min。

2. 倒掉 PBS 缓冲液，加入 1.5 ml 的 1%TritonX—100 溶液，处理 20~30 min，用于抽提非细胞骨架蛋白。

3. 倒掉 TritonX—100 溶液，用 M 缓冲液 (pH7.2) 清洗 3 次，每次 5 min。

4. 倒干净 M 缓冲液，加入 1.5 ml 的 3%戊二醛溶液，固定 30 min。
5. 倒掉磷戊二醛溶液，加入 10.0 mM 的 pH7.2 的 PBS 缓冲液，清洗 3 次，每次 5 min。
6. 倒干净 PBS 缓冲液，加入 0.2%考马斯亮蓝 R250 溶液，染色 15~20 min。
7. 倒去考马斯亮蓝 R250 染液，用蒸馏水洗 2 次，每次 1 min。
8. 将洗净的样品置于干净的载玻片上，加盖玻片，压片，普通光学显微镜下观察。
9. 在显微镜下，可以观察到表皮细胞的轮廓，细胞内存在着被染成蓝色的、粗细不等的纤维网络结构，便是构成细胞骨架的微丝束。
10. 如果染色效果好，则可用 50%乙醇、70%乙醇，95%乙醇、正丁醇、二甲苯依次处理样品 5 min，然后将样品平展于载玻片上，加 1 滴中性树胶，盖上盖玻片封片，制成永久切片。

二、动物细胞骨架的显示与观察

1. 以动物小肠组织为实验材料，刀片切取小肠组织薄片 1 片，置于 1.5 ml 离心管中，加入 10.0 mM 的 pH7.2 的 PBS 缓冲液 1.5 ml，使其浸在溶液中，处理 5~10 min。
2. 倒掉 PBS 缓冲液，加入 1.5 ml 的 1%TritonX—100 溶液，处理 20~30 min，用于抽提非细胞骨架蛋白。
3. 倒掉 TritonX—100 溶液，用 M 缓冲液（pH7.2）清洗 3 次，每次 5 min。
4. 倒干净 M 缓冲液，加入 1.5 ml 的 3%戊二醛溶液，固定 30 min。
5. 倒掉磷戊二醛溶液，加入 10.0 mM 的 pH7.2 的 PBS 缓冲液，清洗 3 次，每次 5 min。
6. 倒干净 PBS 缓冲液，加入 0.2%考马斯亮蓝 R250 溶液，染色 30 min。
7. 倒去染液，用蒸馏水洗 2 次，每次 1 min。
8. 将洗净的样品置于干净的载玻片上，加盖玻片，压片，普通光学显微镜下观察。
9. 在显微镜下，可以观察到细胞内存在着被染成蓝色的、粗细不等的纤维网络结构，便是构成细胞骨架的微丝束。
10. 如果染色效果好，则可用 50%乙醇、70%乙醇，95%乙醇、正丁醇、二甲苯依次处理样品 5 min，然后将样品平展于载玻片上，加 1 滴中性树胶，盖上盖玻片封片，制成永久切片。

【实验结果与思考题】

1. 描绘所观察到的植物和动物细胞的细胞骨架图。
2. 简述在光学显微镜下观察细胞骨架的实验原理。

实验十 植物原生质体分离和活性鉴定

【实验目的】

- 1.掌握植物细胞原生质体分离的方法。
- 2.了解原生质体活性鉴定的原理。

【实验原理】

植物原生质体(protoplast)是除去植物细胞壁后,由原生质所包围的“裸露细胞”,是开展基础研究的理想材料。原生质体可以从培养的单细胞、愈伤组织和植物器官(如叶片、下胚轴等)获得。一般从叶肉组织分离原生质体是最理想的,其优点是取材方便,材料来源充足,且遗传性较为一致。

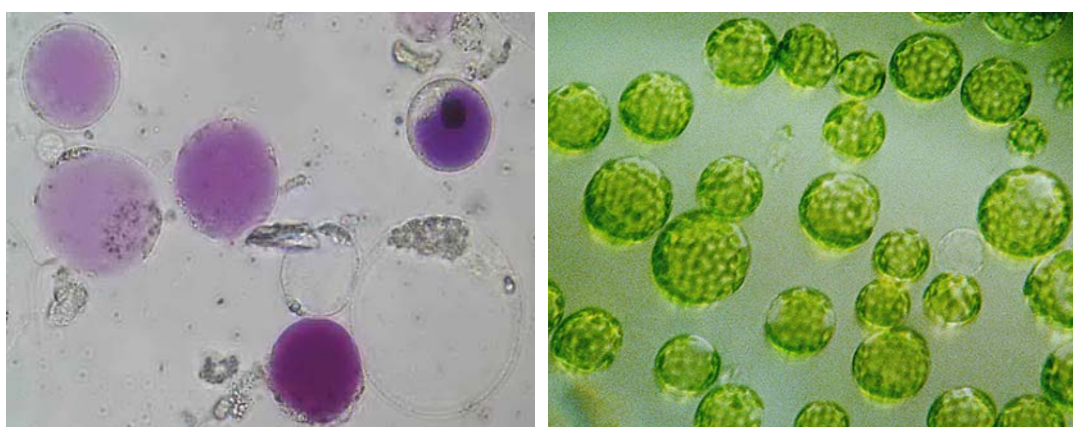


图 11 分离得到的植物原生质体(左图来源于紫甘蓝,右图来源于拟南芥)

原生质体的分离通常采用酶解法,其原理是植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶质组成,因而使用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶能降解细胞壁成分,除去细胞壁,即可得到原生质体。由于原生质体内部与外界环境之间仅隔一层薄薄的细胞膜,因此原生质体的分离过程必须保持在渗透压平衡的溶液中进行,才能保持其结构的完整性,常用的渗透压稳定剂包括甘露醇、山梨醇、蔗糖等。其次,还应当考虑取材、酶的种类和纯度、酶液的渗透压、酶解时间及温度等因素对分离原生质体的影响。

原生质体分离后,一般要对原生质体的活性进行测定和评价。测定原生质体的活性有多种方法,常用的有染色法和胞质环流法。染色法和采用荧光素双醋酸酯(FDA)、酚藏花红、伊文思蓝等染料染色,然后显微镜下检测观察。其中 FDA 本身无荧光无极性,进入活的原生质体后,被酯酶分解而产生具有荧光的极性物质荧光素,可用荧光显微镜观察到黄绿色荧光,无活力的原生质体不能分解 FDA 无荧光产生。用 0.01%的酚藏花红对原生质体染色后,活的原生质体被染成红色。用 0.25%的伊文思蓝对原生质体染色后,染成蓝色的原生质体是无活力的,没染成蓝色的原生质体是有活力的。

原生质体的分离和活性检测是植物原生质体融合和培养的前提,原生质体融合在植物遗传工程和育种研究上具有广阔的应用前景,是植物同源、异源多倍体获得的途径之一,它

不仅能克服远缘杂交有性不亲和障碍，也可克服传统的通过有性杂交诱导多倍体植株的麻烦，最终将野生种的远缘基因导入栽培种中，是作物遗传改良的有力手段之一。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：烟草幼苗叶片，或菠菜叶片，大豆。

(二) 器具：普通光学显微镜，超净工作台，刀片，镊子，培养皿，10 ml 离心管，载玻片，过滤漏斗，200 目筛网，吸管，高压蒸汽灭菌锅，解剖刀，移液器，摇床，离心机。

(三) 试剂：

1. 0.1% MES (2-N-吗啡啉乙磺酸钠)：称取 2-N-吗啡啉乙磺酸钠 1.0 g，蔗糖 200g 蔗糖，用蒸馏水溶解，调节 pH 至 6.0，定容至 1 L。

2. 烟草酶解液：称取 10 g 纤维素酶，5 g 果胶酶，3.59 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，54.6 g 甘露醇，溶于 0.1% MES 溶液中，定容至 500 ml。

3. 洗涤液(烟草)：称取 11.1 g 氯化钙，溶解于 0.1% MES 溶液中，定容至 500 ml。

4. 20%蔗糖溶液：称取 200 g 蔗糖，溶于 1 L 的蒸馏水中。

5. 无菌蒸馏水。

6. 0.25%的伊文思蓝：称取 0.25 g 伊文思蓝，溶于 100 ml 蒸馏水中。

7. 酶解液(绿豆)：称取 5.0 g 纤维素酶，5.0 g 果胶酶，54.6 g 甘露醇，0.73g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.048g KH_2PO_4 ，溶于蒸馏水中，将pH调至 6.0，定容至 500 ml。

8. 13%CPW洗涤液(绿豆)：称取 27.2 mg KH_2PO_4 ，101.0 mg KNO_3 ，1480.0 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，246.0 mg MgSO_4 ，0.16 mg KI，0.025 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，130 g 甘露醇，溶于蒸馏水中，调节pH6.0，定容至 1 L。

【实验步骤】

一、烟草幼苗叶片的原生质体分离：

1. 取烟草种子播种，生长出苗。
2. 取生长良好的幼嫩烟草叶片，用自来水冲洗干净。
3. 在超净工作台上，叶片用 0.1% 升汞溶液中浸泡灭菌 10 min，中间摇动几次，使溶液充分接触叶片。
4. 取出叶片，无菌蒸馏水漂洗 5 次。
5. 将叶片放入大培养皿中，吸去水分，叶背面朝上，用解剖刀将叶片切成 0.5 mm 宽的小条。
6. 另取 1 个培养皿，加入酶解液 10 ml，放入切好的叶片约 2g，在 30~35℃保温 2 h，中间轻轻摇动 2~3 次。
7. 用 200 目筛网过滤酶解液，去除酶解不完全的组织碎片。
8. 取 8 ml 滤液转入灭菌的 10 ml 离心管中，经 600×g 离心 5 min，使原生质体沉淀下来。
9. 用移液器吸去上清液，将沉淀的原生质体悬浮在 4 ml 的 0.2 M CaCl_2 洗涤液中。

10. 用注射器(装上长针头)向离心管底部缓缓注入 20%蔗糖 4 ml, 在 600×g 离心 5 min。
11. 离心结束, 在两相溶液的界面之间出现一层纯净的完整原生质体, 杂质和碎片都沉到管底。
12. 取原生质体提取液 1 滴于载玻片上, 加入相同体积的 0.25%的伊文思蓝, 对原生质体染色 5min 后, 于显微镜下观察, 染成蓝色的原生质体是无活力的, 没染成蓝色的原生质体是有活力的。

二、绿豆幼苗下胚轴分离原生质体:

1. 绿豆种子用 70%乙醇消毒, 自来水流水浸泡 4h 左右, 置于湿润滤纸上萌发。25℃黑暗中培养约 3 d。
2. 取黄化幼苗下胚轴或根 2~3g, 切成 0.5mm 的薄片置于 10 ml 酶解液中(也可以取 1cm 左右的绿豆幼苗的根尖作为实验材料, 直接置于酶解液中)。置于水浴摇床上, 30~35℃, 60~70r/min, 酶解 2 h。
3. 用 200 目筛网过滤酶解液, 滤液转入 10 ml 离心管中, 经 1000 rpm 离心 5 min, 弃去上清液。
4. 用 4 ml 的 13%CPW 溶液洗涤并悬浮沉淀。
5. 取 10 ml 离心管 1 支, 注入 4 ml 20%蔗糖溶液, 将悬浮的原生质体溶液用滴管吸出, 小心地铺于蔗糖溶液上, 1000rpm 离心 5~8 min。
6. 将位于两相溶液中间一层原生质体较为纯净, 用吸管小心吸出, 转至另一离心管中, 用 13%CPW 液洗涤 1~2 次, 每次 1000rpm 离心 5min, 得到较为纯净的原生质体沉淀。
7. 用 13%CPW 液悬浮至一定密度, 取 1 滴原生质体提取液在载玻片上, 滴加 1 滴 0.25%的伊文思蓝, 对原生质体染色 5min 后, 于显微镜下观察, 染成蓝色的原生质体是无活力的, 没染成蓝色的原生质体是有活力的。

【实验结果与思考题】

1. 描述观察到的原生质体的形态。
2. 你认为要获得数量多、生活力强的原生质体, 在实验中应注意那些问题?
3. 除了本实验介绍的方法, 还可以用哪些方法判断分离的原生质体活力?

实验十一 聚乙二醇法诱导的细胞融合

【实验目的】

1. 了解细胞融合的原理。
2. 初步掌握用 PEG 诱导细胞融合的方法。

【实验原理】

细胞融合，是在自然条件下或利用人工方法，使两个或两个以上的细胞合并成一个具有双核或多核细胞的过程。由于不仅同种细胞可以融合，种间远缘细胞也能融合，甚至于动植物细胞也能合二为一，因此细胞融合技术目前较广泛应用于细胞生物学、遗传学和医学研究等各个领域，并且取得显著的成绩。

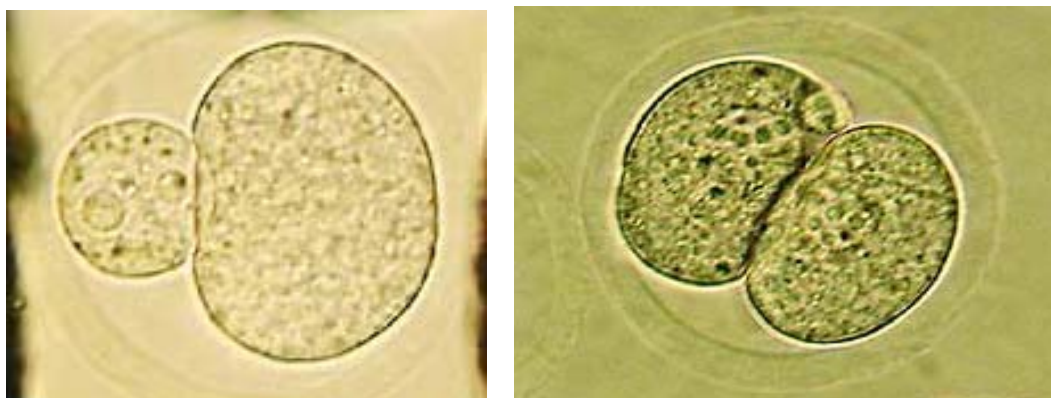


图 12 细胞融合的显微观察

许多化学、物理学和生物学方法可诱导原生质体融合，其中物理法包括电融合、激光融合等，化学融合法包括聚乙二醇（PEG）法等，生物融合法包括仙台病毒介导细胞融合等。现在被广泛采用并证明行之有效的融合方法是聚乙二醇（PEG）法、高Ca高pH法和电融合法。聚乙二醇(PEG) 作为一种高分子化合物，其分子结构为： $\text{HOH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ ，分子量在 200~6000 之间，均可用作细胞融合剂。

PEG诱导融合的机理：PEG由于含有醚键而具负极性，与水、蛋白质和碳水化合物等一些正核化基团能形成氢键，能改变各类细胞的膜结构，使两细胞接触点处的质膜的脂类分子发生疏散和重组。当PEG分子足够长时，可作为邻近原生质表面之间的分子桥而使之粘连。PEG也能连接 Ca^{2+} 等阳离子， Ca^{2+} 可在一些负核化基团和PEG之间形成桥，因而促进粘连。随后用高 Ca^{2+} 高pH法进行清洗，在洗涤过程中，连接在原生质体膜上的PEG分子可被洗脱，这样将引起电荷的紊乱和再分布，从而引起原生质体融合。高 Ca^{2+} 高pH由于增加了质膜的流动性，因而也大大提高了融合频率。洗涤时的渗透压冲击对融合也可能起作用。该方法的优点是：用法简单，容易获得融合体，融合效果好。

细胞融合率是指在显微镜的一个视野内，已发生融合的细胞核总数与该视野内所有细胞(包括已融合的细胞)的细胞核总数之比，通常以百分比表示。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：牛蛙血红细胞，鸡血红细胞。

(二) 器具：光学显微镜，离心机，水浴箱，量筒，离心管，注射器，试管，移液器，烧杯，吸管，载玻片，盖玻片。

(三) 试剂：

1. Alsver 溶液：葡萄糖 2.05 g，柠檬酸钠 0.80 g，氯化钠 0.42 g，用柠檬酸溶液调节 pH 值至 7.2，最后用蒸馏水定容至 100 ml 即可。

2. 0.85%生理盐水：0.85 g 氯化钠溶于 100 ml 蒸馏水中。

3. GKN 溶液：氯化钠 8.0 g，氯化钾 0.40 g，磷酸氢二钠 1.77 g，磷酸二氢钠 0.69 g，葡萄糖 2.0 g，酚红 0.01g，溶解定容于 1 L 重蒸水中。

4. Ringer 溶液：氯化钙 0.25g，氯化钾 0.42g，氯化钠 6.5g，溶于 1 L 蒸馏水中。

5. 50%PEG 混合液：称取适当的 PEG(Mw4000)放入刻度离心管内，在沸水浴中加热，使其溶化，待冷却至 50℃时，加入预热至 50℃的等体积的 GKN 溶液，混匀。注意使用前配制。

6. 0.2%次甲基蓝溶液：精密称取次甲基蓝 0.10 g，用水溶解并稀释至 100 ml，贮于棕色试剂瓶中备用。

【实验步骤】

1. 鸡血红细胞悬液的制备：用注射器吸入 1 ml 的 Alsver 溶液后，从鸡翼下静脉取鸡血 1~2 ml，注入刻度离心管内，按照 1: 3(V/V)加入 6 ml 的 Alsver 溶液混匀，放入 4℃冰箱内可保存 3--4 天。

2. 取细胞悬液 1 ml，转移到 10 ml 离心管中，加入 4 ml 的 0.85%生理盐水，混匀。置于离心机中 1500 rpm 离心 5 min。

3. 离心后，弃上清液(移液器吸去)，得沉淀，加 0.85%生理盐水至 5 ml，混匀后 1500 rpm 离心 5 min。重复上述条件，再离心洗涤 1 次。

4. 收集最后 1 次离心沉淀的血细胞，加入 3~5 ml 的 GKN 溶液或 Ringer 溶液，配成红细胞悬液。

5. 取悬液 1 ml 到 1 个试管中，加入 0.5~0.8 ml 预热的 50%PEG 混匀，置于 37℃水浴中温浴 2 min。

6. 加入 Ringer 溶液 5 ml 以终止 PEG 的作用，取血细胞悬液 1 滴滴于载玻片上，再加入 0.2%次甲基蓝溶液 1 滴，盖上盖玻片。

7. 利用光学显微镜或倒置显微镜(高倍)，观察 2 个靠近细胞或 3 个细胞形成融合的过程。

8. 进行多个视野的计数测定，统计平均融合率。

【实验结果与思考题】

1. 绘制观察到的细胞融合图。

2. 计算观察到的细胞融合率。

实验十二 细胞中 DNA 的 Feulgen 染色观察

【实验目的】

1. 了解 Feulgen 反应的基本原理。
2. 学习 Feulgen 染色的操作方法和压片法。
3. 初步掌握细胞分裂各期的主要特点。

【实验原理】

核酸是生物最重要的组成成分，核酸分为两大类，即脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。它们在细胞内的分布及化学性质均有所不同。DNA 主要分布在细胞核的染色质或有丝分裂过程中出现的染色体中。RNA 分布在细胞质和核仁内。但在染色质及染色体中也含有少量的 RNA，核仁中也有少量的 DNA。在线粒体，叶绿体等细胞器内除含有 RNA 外，也含有少量的 DNA。

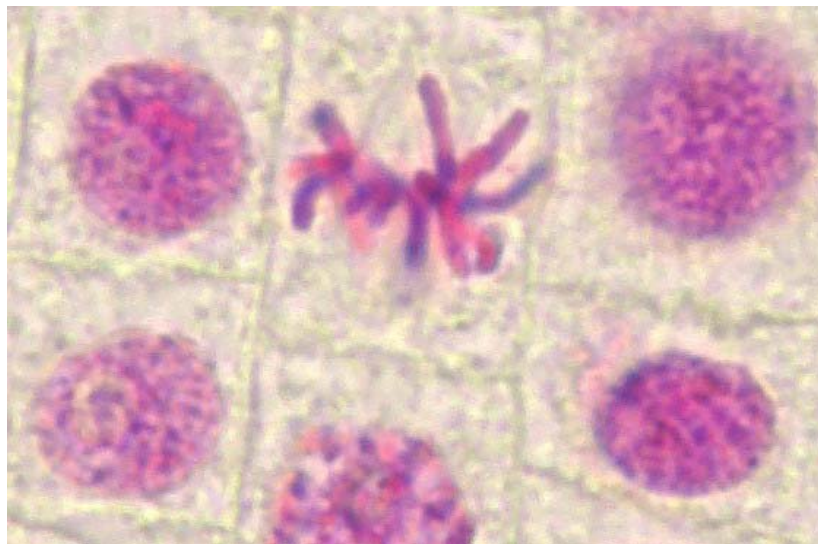


图 13 DNA 的 Feulgen 染色观察

DNA 是由许多单核苷酸聚合成的多核苷酸，每个单核苷酸又由磷酸、脱氧核糖和碱基构成。DNA 经 1M 盐酸水解，其上的嘌呤碱基和脱氧核糖之间的键打开，使脱氧核糖的第一碳原子上形成游离的醛基，这些醛基就在原位与 Schiff 试剂结合，形成含醌基的化合物，产生紫红色。Schiff 试剂是由碱性品红和偏重亚硫酸钠相互作用，形成的无色品红溶液，当无色品红与醛基结合则形成紫红色的化合物，因此凡有 DNA 的地方，都能显示紫红色。紫红色的产生是由于反应产物的分子内含有醛基，醛基是一个发色基团，所以具有颜色。材料不经过盐酸水解，或者预先用热的三氯醋酸或 DNA 酶处理后，得到的反应是阴性的，从而证明了 Feulgen 反应的专一性。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料：洋葱鳞茎或根尖。

(二) 器具：显微镜、恒温水浴箱、温度计、解剖针、酒精灯、试管、烧杯、载玻片、盖玻片、吸水纸，镊子，1.5ml EP 离心管，量筒，试剂瓶。

(三) 试剂:

1. 5%三氯乙酸: 量取三氯乙酸10 ml, 加入蒸馏水, 定容至200 ml。
2. Carnoy 固定液: 无水乙醇60ml, 氯仿30ml, 冰醋酸10ml, 混匀备用。
3. 90%酒精。
4. 70%酒精。
5. 1.0 M盐酸溶液: 量取82.5 ml浓盐酸, 加蒸馏水稀释至1 L。

6. Schiff试剂: 将碱性品红0.50克加入100 ml沸水, 持续煮沸5min, 并随时搅拌, 待冷却到50℃时过滤到棕色瓶中, 加1.0 M的盐酸10 ml, 冷却至25℃时加入0.50 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (偏重亚硫酸钠), 此时需充分的振荡, 在黑暗处静置24 hr。使其颜色变成呈淡黄色, 加0.50 g活性炭剧烈振荡1min。过滤后即得Schiff试剂, 装入棕色瓶中, 外包黑纸, 放到4℃冰箱避光保存。使用前升至室温。注意随时盖紧瓶口, 不要过长时间暴露在空气中, 并用黑纸或暗盒避光, 以避免氧化变成红色。如变成红色即失去染色能力, 可加入少许偏重亚硫酸钠或碘, 使之再转变为无色时, 仍可再用。如有白色沉淀, 就不能再使用。

7. 亚硫酸水溶液: 称取1.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (偏重亚硫酸钠), 溶于100 ml蒸馏水中, 再加入10 ml 1.0 M盐酸, 定容至200 ml, 现用现配。

【实验步骤】

一、DNA Feulgen 反应的制片

1. 切取蚕豆根尖或洋葱根尖根尖, 长度 0.3-0.5cm, 放入 1.5 ml EP 离心管中。
2. 加入 1.0 ml 的 Carnoy 固定剂, 固定 10~20 min。
3. 用 95%酒精, 处理 5 min。
4. 用 70%酒精, 处理 5 min。
5. 蒸馏水漂洗一下, 加入 1M HCl, 60℃水浴处理 8 min。
6. 用蒸馏水漂洗一下, 加入 Schiff 试剂, 染色 30 min。
7. 亚硫酸水溶液清洗 3 次, 每次 5min
8. 自来水将染色后的根尖漂洗干净, 选择着染色效果好的材料, 压片。
9. 压片的操作步骤如下, 把根尖放在载片上, 用刀片切取根尖(0.3cm), 纵切根尖, 加一滴水, 用解剖针将根尖纵向分成若干小条, 保留 1-2 小条, 加盖玻片, 用铅笔端轻轻敲击盖玻片, 使细胞分离、压平呈云雾状。
10. 显微镜下观察。首先在低倍镜下, 区分根尖的分生组织区及伸长组织区的细胞, 然后, 在高倍镜下, 观察细胞核的形态, 注意在你的片子上, 是否有有丝分裂细胞, 如有, 你能找到细胞分裂期的几个阶段, 其特征如何?

二、对照片的制备

方法一: 先将材料放在5%三氯乙酸中90℃水浴15min, 主要把DNA抽提掉, 然后按步骤1~10制片观察。

方法二: 材料不经1M HCl处理, 直接放在Schiff试剂中染色, 然后按步骤6~10制片观察。

三、做 Feulgen 反应的注意事项

1. 固定剂的选择：一般常选用 Carnoy 固定液。其他的固定剂如 Flemming 固定剂及 Champy 固定剂等均可用，但不能使用 Bouin 固定剂。
2. 水解时间：水解时间一定要合适，不宜过长或不足，否则会影响实验结果。如用 Carnoy 固定液固定的材料，水解时间一般在 8~15 min 之间。水解时间的长短要随不同的材料及不同的固定剂而定。
3. Schiff试剂的质量：在做Feulgen反应时，一个重要的成功因素就是Schiff试剂的质量问题。实验时，要注意试剂颜色是否正常、有无SO₂的气味。
4. 洗涤剂的重要性：漂洗时，所用的亚硫酸水，最好在每次实验前临时配制，以便保持较浓的SO₂。
5. 实验对照组：一定要做对照片，以便说明实验结果的真实性。
6. 操作过程中，用镊子镊取根尖的生长区部位，切勿夹取根冠部位。压片过程中尽量使根尖分生组织细胞保持原来的分布状态。

【实验结果与思考题】

0. 简述 Feulgen 反应的原理和实验的关键步骤。
1. 绘图示洋葱根尖细胞或鳞茎表皮细胞 DNA 的分布部位。
2. 欲得到一张好的 Feulgen 反应制片，制片过程中应注意些什么？
3. 绘制细胞分裂图。

【附录】植物细胞分裂的几个时期

细胞周期 (cell cycle) 是指细胞从前一次分裂结束起到下一次分裂结束为止的活动过程，分为间期与分裂期两个阶段。间期又分为三期：即DNA合成前期 (G₁ 期)、DNA合成期 (S 期) 与DNA合成后期 (G₂ 期)。间期细胞的细胞核有下述特点：核膜清楚，核内结构均匀，除异染色质外，可见 1—2 个着色较深的核仁。

G₁ 期：此期长短因细胞而异。体内大部分细胞在完成上一次分裂后，分化并执行各自功能，此G₁ 期的早期阶段特称G₀ 期。在G₁ 期的晚期阶段，细胞开始为下一次分裂合成DNA所需的前体物质、能量和酶类等。

S 期：是细胞周期的关键时刻，DNA经过复制而含量增加一倍，使体细胞成为 4 倍体，每条染色质丝都转变为由着丝点相连接的两条染色质丝。与此同时，还合成组蛋白，进行中心粒复制。S期一般需几个小时。

G₂ 期：为分裂期做最后准备。中心粒已复制完毕，形成两个中心体，还合成RNA和微管蛋白等。G₂ 期比较恒定，需用 1~1.5 小时。

分裂期是细胞进行有丝分裂 (mitosis) 的时期，需经前、中、后，末期，是一个连续变化过程，由一个母细胞分裂成为两个子细胞。一般需1~2 小时。

前期 (prophase) 染色质丝高度螺旋化，逐渐形成染色体 (chromosome)。染色体短而粗，

强嗜碱性。两个中心体向相反方向移动，在细胞中形成两极；而后以中心粒随体为起始点开始合成微管，形成纺锤体。随着核仁相随染色质的螺旋化，核仁逐渐消失。核被膜开始瓦解为离散的囊泡状内质网。

中期（metaphase）细胞变为球形，核仁与核被膜已完全消失。染色体均移到细胞的赤道平面，从纺锤体两极发出的微管附着于每一个染色体的着丝点上。从中期细胞可分离得到完整的染色体群，分离的染色体呈短粗棒状或发夹状，均由两个染色单体借狭窄的着丝点连接构成。

后期（anaphase）由于纺锤体微管的活动，着丝点纵裂，每一染色体的两个染色单体分开，并向相反方向移动，接近各自的中心体，染色单体遂分为两组。与此同时，细胞波拉长，并由于赤道部细胞膜下方环行微丝束的活动，该部缩窄，细胞遂呈哑铃形。

末期（telophase）染色单体逐渐解螺旋，重新出现染色质丝与核仁；内质网囊泡组合为核被膜；细胞赤道部缩窄加深，最后完全分裂为两个 2 倍体的子细胞。

实验十三 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁原位染色法

【实验目的】

1. 了解甲基绿-派洛宁原位染色法的原理，掌握有关的操作方法。
2. 了解 DNA 和 RNA 在细胞内分布。

【实验原理】

1899 年 Pappenheim 首创了甲基绿-派洛宁(methyl-green-pyronin)染色法。1902 年 Unna 对这一方法进行了改良。1940 年 Brachet 研究证明甲基绿-派洛宁对 DNA 和 RNA 有选择性的染色效果，又称为Unna染色法和Brachet染色法。

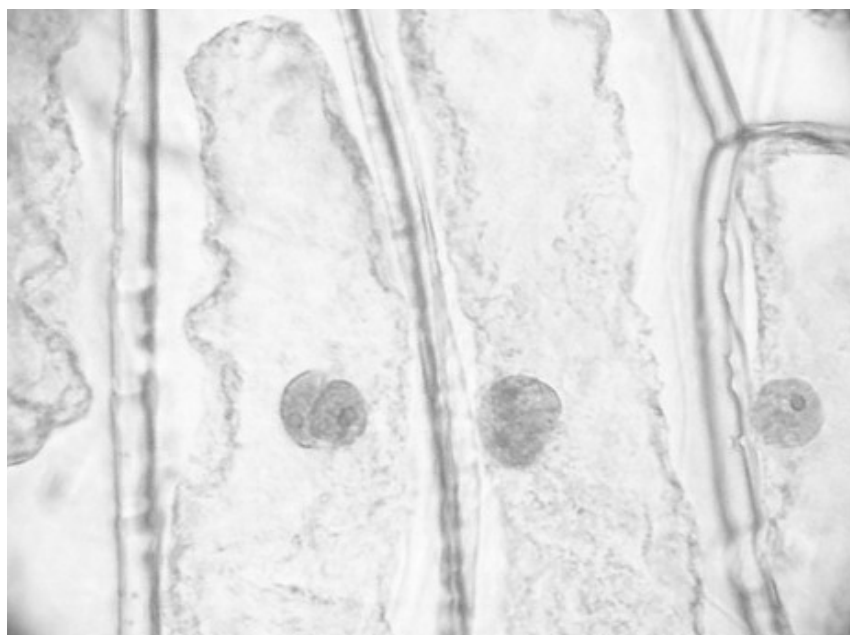


图 14 DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁原位染色观察

甲基绿-派洛宁(methyl green-pyronin)为碱性染料，它分别能与细胞内的DNA、RNA结合呈现不同颜色。当甲基绿与派洛宁作为混合染料时，甲基绿与染色质中DNA选择性结合显示绿色或蓝色；派洛宁与核仁、细胞质中的RNA选择性结合显示红色。其原因可能是两种染料的混合染液中有竞争作用，同时两种核酸分子都是多聚体，而其聚合程度有所不同。甲基绿易与聚合程度高的DNA结合呈现绿色。而派洛宁则与聚合程度较低的RNA结合呈现红色（但解聚的DNA也能和派洛宁结合呈现红色）。即RNA对派洛宁亲和力大，被染成红色，而DNA对甲基绿亲和力大，被染成绿色。这样就能使细胞中两种核酸分布显示出来。

【材料、器具和试剂】

(一) 材料：洋葱鳞茎。

(二) 器具：显微镜、镊子、载玻片、盖玻片、吸水纸显微镜、载玻片、盖玻片、烧片、培养皿、吸管、镊子、刀片、分液漏斗等。

(三) 试剂：

1. 0.2M 醋酸缓冲液 (pH4.8): 称取 1.632 g 三水醋酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 溶于蒸馏水中, 加入 0.48ml 冰醋酸, 溶解混匀, 定容至 100 ml。

2. 2% 甲基绿 (Methyl green): 先称取甲基绿 1.0 g, 溶解在 50 ml 蒸馏水中, 配制 2% 甲基绿水溶液, 因 Methyl-green 商品常混有甲基紫, 影响染色效果, 应溶液置于分液漏斗中, 加氯仿洗涤抽提, 去除含有的甲基紫成分, 弃除氯仿, 反复多次直至氯仿层中不显紫色, 得到水相层备用。

3. 1% 派洛宁 (Pyronin): 先称取派洛宁 1.0 g, 溶解在 100 ml 的 0.2 M 的醋酸缓冲液中, 可以加热助溶, 备用。

4. 甲基绿—派洛宁混合染液: 将配好的 2% 甲基绿和 1% 派洛宁以 5: 2 的比例混合即可。

【实验步骤】

1. 用镊子撕取洋葱鳞茎内表皮一小块, 置于载玻片上。
2. 用吸管吸取甲基绿—派洛宁溶液, 滴1滴在洋葱表皮上, 染色30 min。
3. 用蒸馏水快速冲洗两次, 用吸水纸吸去多余的水分, 以防派洛宁脱色。
4. 盖上盖玻片, 显微镜下观察。

5. 可以观察到富含RNA的细胞质被染成红色, 富含DNA的细胞核被染成绿色。如果制片效果好, 还可以在高倍镜下观察到细胞核中被染成红色的1~3个核仁。

【实验结果与思考题】

1. 简述甲基绿—派洛宁染色反应的原理。
2. 绘图显示细胞中染色的结果, 并说明RNA和DNA的分布。

实验十四 植物染色体结构与 Giemsa 分带技术

【实验目的】

1. 掌握植物染色体分带的原理与方法。
2. 通过实验，掌握植物染色体Giemsa分带技术和方法。
3. 学习染色体带型分析方法。

【实验原理】

植物染色体分带是借助特殊的处理程序，使染色体的一定部位显示出深浅不同的染色带纹。这些带纹具有物种及不同染色体的特异性，每条染色体上带的数目、部位、宽窄与浓淡具有相对的稳定性，从而在以往的染色体形态特征之外又增添了一类新标记，可以更有效地鉴别染色体和染色体的结构与功能。事实证明，几乎所有的植物染色体都能显带，植物染色体显带的原理和动物染色体显带原理相似，是由于特殊的染料和染色体上的结构成分发生特异反应而产生的，并且因所用染料与处理条件不同可产生不同的带型，因此有C带、N带、G带等不同的显带技术。C带又称为结构异染色体带，主要显示着丝粒、端粒、核仁组织区或染色体臂上的结构异染色质。N带能使染色体核仁组织区特异着色，而G带技术能显示出植物染色体上的中间带，从而为种间鉴定、染色体或染色体亚单位的识别，以及基因定位的研究展示了新的前景。

植物染色体Giemsa分带技术是本世纪70年代以来兴起的一项细胞技术，它已广泛用于植物细胞学、细胞遗传学、植物分类学、物种起源、染色体工程、植物育种等方面研究。显带原理是借助于特殊的处理程序后，进行Giemsa染色。使染色体某些结构成分发生特异反应而出现深浅不同的带纹；从而使核型分析中更准确地识别染色体的每个成员以及其结构变异。通过改变Giemsa分带处理程序可产生不同带型，因此有C带、G带、N带、Q带、T带等不同技术。

C带(组成异染色质带): C带技术是应用最广泛的技术，它主要显示着丝粒、端粒，核仁组成区域或染色体臂上某些部位的组成异染色质而产生相应的着丝粒带、端粒带，核仁组成区带，中间带等，这些带可以在一条染色体上同时出现，也可以只有其中的一条或几条带。

G带(Giemsa带): 显示染色粒，G带分布于染色体的全部长度上，以深浅相间的横纹形式出现。也有人认为G带显示的是染色体本身固有的结构，G带能清楚地反映染色体的纵向分化，能提供较多的鉴别标志，因此，G带是分带技术中最有价值的一种，目前G带技术在我国处于领先地位。

R带(反带): 与G带相反的染色带。由于处理程序不同，染色体在同一部位，G带染色深处R带染色浅处，反之，G带染色浅处R带染色深处。N带：专一地显示出核仁组织区。T带：专一地显示出端粒区域。

【材料、器具和试剂】

(一) 材料：玉米、黑麦、大麦、蚕豆、洋葱的染色体制片。

(二) 器具：培养箱、恒温水浴锅，分析天平、小台称(200g)、量筒(50ml、100ml、1000ml、

10ml)、烧杯(200ml)、容量瓶(1000ml)、棕色试剂瓶(200ml)、滴瓶、染色缸、载玻片、盖玻片、显微镜、显微照相及冲洗放大设备、剪刀、镊子、刀片、滤纸、玻璃板、牙签、切片盒。

(三) 试剂:

1. Giemsa液: 0.75克Giemsa, 50ml甘油, 50ml甲醇, 用少量甘油将Giemsa粉末研磨至无颗粒, 剩余甘油分次洗涤至棕色瓶内, 置56℃恒温2h, 加入甲醇, 过滤后保存于棕色瓶中。
2. 5%Ba(OH)₂溶液: 5gBa(OH)₂加入100ml沸蒸馏水中溶解后过滤, 冷却至18—28℃。。
3. 2×SSC盐溶液: 0.3M氯化钠+0.3M柠檬酸钠。
4. 1M NaH₂PO₄溶液。
5. 1/15 M的磷酸缓冲液。
6. 0.01%胰蛋白酶(用生理盐水配制)。
7. 8M 尿素溶液。
8. 药品Giemsa母液、磷酸缓冲液、氯化钠、柠檬酸钠、甲醇、乙醇、冰醋酸、氢氧化钡、秋水仙素(或对二氯苯)、α-溴萘、纤维素酶、胰蛋白酶、醋酸洋红、45 %醋酸等。

【方法与步骤】

(一) 植物染色体Giemsa G带技术(通用):

1. 消化液配制: 取0.9%氯化钠注射水100ml, 加0.25%胰蛋白酶1ml, 制成0.025%胰蛋白酶盐水消化液, 加4-5滴tris液调PH6.8左右, 移消化液于立式染色缸并置37℃水浴锅中备用;
2. 染液配制: 取立式染缸, 加蒸馏水500ml, 加3滴tris液调PH并加入Giemsa染液1ml左右, 用吸管调匀备用;
3. 漂洗液: 取立式染缸一个, 内加蒸馏水备用;
4. 试消化: 待消化液温度在37℃左右时, 取同批标本较多者标本1张, 分二节或三节进行消化, 每节相差十五秒左右, 从45秒或60秒开始增减。取出后先在纱布或吸水纸上直立除去带出胰蛋白酶, 后置蒸馏水染缸内漂洗, 取出后, 标本斜面朝上, 刮去染色缸内染液上浮膜, 沿槽插入, 每分钟移动1次, 染色3-5分钟。
5. 洗片: 从染色缸中取出标本玻片, 自来水冲洗, 取刻编号面朝上用纱布干净玻片背部染色, 稍干, 高倍镜下观片, 确定分带与染色时间。
6. 分带: 取4张待分带标本玻片, 细胞面朝左侧按顺序插入37℃的消化液中, 消化时间较试消化选择时间延长5-10秒钟, 取出每片间隔时间约10秒钟左右。
7. 消化及染色调整: 每次消化完一批标本后, 需加入配好的消化液25ml于消化缸中, 下次消化时间不变。同样, 每次染色一批标本后加Giemsa染色液2-3滴, 调匀, 每次染色时间不变;
8. Giemsa染色调整: 若Giemsa染色标本偏红, 说明染色液偏酸, 可加tris数滴调蓝, 若Giemsa染色标本偏蓝则说明tris加多了;
9. 保存: 将分好带的及观察中的标本及时收集于玻片盒内保存, 防止细胞涂面灰尘污

染及擦损。

10. 注意：Giemsa消化染色过程中，有两个重要的环节，一是胰酶消化环节，消化不足带不出现，消化过度染色体变得膨胀和不着色，必须把握好胰酶浓度、消化时间和消化温度；二是预处理或老化环节，对消化和带型清晰度有很大影响，其中80℃进行2小时热处理，是简便易行和效果较好的办法。

(二) 玉米的染色体G带技术

G带显示的是染色体自身固有结构，能否显示出来，与染色体的处理技术密切相关，因此，G带技术要求比C带严格。目前G带已在许多植物上成功显示，但其中稳定性、重复性高的是玉米G带技术。G带技术流程较多，其中最为先进的是武汉大学生物系宋运淳等的ASG技术（醋酸-2×SSC，Giemsa），染色体标本的制作是用去壁低渗火焰干燥法进行的。其步骤如下：

1. 生根：将玉米材料在室温下(25-27℃)发根，待根长到0.5-1.5cm时，转入6-8℃左右低温下处理20-40小时。
2. 预处理：切取根尖分生组织0.2mm用新配制的饱和α-溴萘28℃下预处理3小时。
3. 低渗：用0.075mol/L的KCl室温下处理30分钟。
4. 固定：用新配制的甲醇-冰醋酸(3:1)固定液在室温下固定30分钟。
5. 水洗：固定后的根尖用蒸馏水洗30分钟。
6. 酶解：用2%纤维素酶和2%果胶酶混合溶液(1:1)室温下处理3.5小时。
7. 固定：倒去酶液，再加入固定液置冰箱(0-4℃)中过夜。
8. 制片：取再固定后的根尖置于洁净的载片上，加上固定液用镊子捣碎涂布，并轻轻吹气，促使细胞迅速分散，然后在酒精的火苗上晃动2-3次烤片。以利染色体分散、最后将制好的片在90℃的烘箱中烘烤50分钟。
9. G带处理：将干燥的片子放入60℃2×SSC(pH7.35)盐液中处理40分钟，水洗后随即用0.066mol/L的磷酸缓冲液稀到40-50:1的Gimesa染色40分钟。染完色的片子用蒸馏水淋洗掉染液，于室温下干燥。

(三) 带型分析

植物染色体带型目前还未有统一的国际化标准，实验者可根据目的需要对记录分析的站果进行比较分析不同材料间带型区别，在染色体水平上分析染色体类型和生物的遗传结构，从而比较不同材料之间在遗传上的异同。一般通过以下步骤进行：

1. 核型分析：选择染色体数目完整，长度合适，分带清晰的材料制片进行显微摄影：冲洗放大、核型分析。
2. 描述带型：对各条染色体的带纹位置、宽窄、深浅、形状进行描述。
3. 绘制模式图，在各染色体模式图上标出各条带纹的位置、宽窄、深浅、形状等线条。

【实验作业】

- (1)制备一张质量较高的玉米G带制片。

(2)对实验材料进行带型分析

(3)实验未能得到预期结果者，分析原因。

实验十五 染色体核仁组织区的银染法

【实验目的】

1. 熟悉银染显示染色体核仁组织区的原理和方法。
2. 熟悉染色体上核仁组织区的所在部位及特征。
3. 通过实验，掌握染色体银染方法。

【实验原理】

核仁组成区(nucleolar organizer region, NOR)是细胞核仁的重要组成部分，在人类的染色体中，核糖体基因盘聚于13、14、15、21和22号染色体近端着丝点的短臂次缢痕区域即为NOR。NOR参与转录核糖体RNA(rRNA)、合成蛋白质，NOR数目和形状可能反映rRNA合成水平、细胞增殖状况等。

银染法是显示NOR最简易的方法，银染法技术可以显示中期染色体上的核仁组织区(NOR)。通过银与NOR相关蛋白(一种相对分子质量100 000的酸性非组蛋白，定位于核仁内)的化学结合，光镜下呈现黑色颗粒。由于正在转录或已转录的tRNA基因部位伴有丰富的酸性蛋白，而这种蛋白质含有SH基团和二硫键，能将AgNO₃中的Ag⁺还原成黑色Ag颗粒，故AgNO₃可将具有转录活性的核仁形成区(rRNA基因)特异性地染成黑色，而无转录活性的区域则不着色。酸性蛋白是核仁的主要成分，占核仁量的40%~80%，具有调节rDNA表达的作用。已知哺乳类动物编码18S rRNA，28S rRNA的基因(rDNA)是位于特定染色体的核仁组织区。在人类中期细胞的5对(13~15)和(21~22)近端着丝点染色体短臂的次缢痕区呈现黑色的小球体就是核仁组织区。已证明该小球体是一种酸性蛋白质，它与核糖体RNA的转录活性有关。用DNA-RNA原位杂交技术证明，人类NOR是18S和28S核糖体基因的位点所在。

银染核仁形成区的方法，最早是Goodpasture和Bloom(1975)提出的Ag-As技术。应用这种技术使人类、哺乳动物、两栖类、植物等的核仁形成区(NOR)特异性染为黑色。该技术被称为Ag-As的银染技术，银染色阳性的NORs被称为Ag-NORs，与Hsu等人用原位分子杂交得到的结果比较，表明Ag-NORs就是18S+28S核糖体基因(rDNA)的分布区，后证实染色的不是rDNA基因本身，而是与rDNA转录有关的一种酸性蛋白。因此，银染色的是有转录活性的NORs。银染方法的原理可能是由于转录的rDNA部分有丰富的酸性蛋白，它们具有S—H键和S—S键，容易将Ag⁺还原为Ag的颗粒，从而在活性的核仁形成区镀上银，呈现为黑色的区域。本实验将介绍染色体核仁形成区的银染显示法(Ag-NOR)，并了解Ag-NOR的多态现象。

【材料、器具和试剂】

(一) 材料：人染色体标本。

(二) 器具：显微镜、恒温水浴箱、培养箱、培养皿、载玻片、盖玻片、镊子、吸管，显微镜、冰箱、恒温水浴锅、温度计、大培养皿、烧杯、吸管、滴瓶、切片架、切片盒、镊子。硝酸银、明胶、甲酸、擦镜纸。

(三) 试剂：

1. 50%硝酸银 (AgNO_3) 溶液: 称取5.0 g硝酸银溶解在10 ml蒸馏水中, 保存在铝箔包裹的玻璃容器内, 可稳定保存1年。

2. 明胶显影液: 称取2.0 g明胶粉末, 溶解在99 ml蒸馏水中, 加1ml甲酸。

3. 氨银溶液: 称取4.0 g的 AgNO_3 溶于5 ml蒸馏水中, 再加入5 ml浓氨水(NH_4OH)。

4. 3%甲醛溶液: 取3 ml的36%甲醛溶液, 加蒸馏水97 ml, 用4g无水醋酸钠调 $\text{pH}=7.0$, 4°C 保存, 使用前用甲酸将 pH 调至4.5。

5. 吉姆萨 (Giemsa) 染色液原液: 配方是0.5 g Giemsa + 33 ml甘油 + 33 ml甲醇。配制方法是: 在研钵内先用少量甘油与Giemsa粉混合, 研磨至无颗粒为止, 再将其余甘油倒入, 搅拌后 56°C 水浴保温2小时, 再加入甲醇, 搅匀后保存于棕色瓶中。

6. 吉姆萨 (Giemsa) 染色液应用液: 用 0.1M $\text{pH}7.4$ 磷酸缓冲液稀释吉姆萨染色液原液10倍。

7. 0.1M磷酸盐缓冲液($\text{pH}7.4$): 取磷酸二氢钾1.36g, 加0.1mol/L氢氧化钠溶液79ml, 用水稀释至100 ml, 即得。

【方法与步骤】

一、硝酸银染色法

1. 在一培养皿底部放一张蒸馏水润湿的滤纸, 上放两根竹签, 置水浴内保温 60°C 。
2. 将人染色体标本片平放在预热的培养皿滤纸上, 用50%硝酸银溶液与2%明胶溶液以2:1混匀后, 立刻滴加到染色体制片上, 立即覆以盖玻片。
3. 待反应液由无色透明变黄, 最后变成棕褐色后 (约2~4分钟), 立即取出载玻片。
4. 用预热的蒸馏水冲洗, 2% Giemsa染色10~15s。
5. 用蒸馏水冲洗, 晾干。
6. 加盖玻片, 压片, 显微镜下观察。
7. 染色适度的片子, 染色体为金黄色, NOR为黑色。

二、氨银染色法(Ae-As染色)

1. 在一张片龄在一周内的人染色体标本上, 滴加4~8滴50% AgNO_3 溶液, 立即覆以盖玻片, 放入潮湿密封的培养皿中, 置 60°C 温箱中温育10 min。
2. 取出用流水冲去盖片, 再以蒸馏水洗2次, 室温晾干。
3. 用吸管加4滴氨银溶液和4滴3%甲醛溶液($\text{pH}4.5$)于染色体标本上, 立即覆以盖玻片, 室温条件下作用12 min。
4. 流水冲去盖片, 再以蒸馏水洗净。
5. 用2%Giemsa复染10~15s。
6. 水洗, 空气干燥, 镜检。
7. 实验结果: 以上两法各有优缺点, 银染法染色得到的染色体标本上仅仅显示Ag-NOR, 染色体臂并不着色, 图像颜色较淡。Ae-As染色, 图像颜色鲜明, 但染色体有时失真, 染色体臂有时也被银染色。

【注意事项】

1. 用于Ag-NOR染色的染色体标本，最好是新鲜制备的，以一周以内的制片为好，同时片内要求有众多的分裂相。
2. 银染用的两种反应液最好新配，一时用不完可装棕色瓶中，冰箱 4℃ 保存，但不得超过 10 天。
3. 配制和使用硝酸银溶液时要格外小心，不要滴洒在地上、桌上及手上等处，氧化为黑色的污点极难除去。
4. 在明胶中添加甲酸可促进反应过程（2 克明胶+99 毫升蒸馏水+1 毫升甲酸）。

5. 3%甲醛溶液的 pH 必须调至 4.5。

【实验结果与思考题】

1. 简述核仁组织区NOR银染的原理。
2. 绘图记录核仁组织区NOR银染的结果。

实验十六 细胞凋亡的检测

【实验目的】

1. 掌握细胞凋亡的检测方法。
2. 加深对于细胞凋亡现象及本质的理解。
3. 练习从形态学角度评价细胞凋亡。

【实验原理】

细胞凋亡(Apoptosis), 又称细胞程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD), 是指细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自己结束其生命的过程。它是一个主动的, 高度有序的, 基因控制的, 一系列酶参与的过程。细胞坏死(necrosis): 是极端的物理、化学因素或严重的病理性刺激引起的细胞损伤和无序变化的死亡过程。细胞凋亡与坏死是两种截然不同的细胞学现象。主要特征区别: 细胞凋亡中, 细胞质膜反折, 包裹断裂的染色质片段或细胞器, 逐渐分离形成众多的凋亡小体(apoptotic bodies), 凋亡小体被邻近的细胞吞噬。整个过程中, 细胞质膜保持完整, 细胞内容物不会逸散到胞外, 不引发炎症反应。细胞坏死时, 表现为细胞 胀大, 细胞质膜发生渗漏, 细胞内容物释放到胞外, 核变化较慢, DNA 降解不充分, 引起局部严重的炎症反应。

细胞凋亡在形态学上可分为三个阶段: (1) 凋亡的起始。细胞凋亡的起始, 染色质固缩、分离并沿核膜分布, 细胞质亦发生固缩; (2) 凋亡小体的形成。细胞质膜反折, 包围细胞碎片, 如染色质片断和细胞器, 形成芽状突起, 以后逐渐分隔, 形成凋亡小体; (3) 凋亡小体逐渐为邻近的细胞所吞噬并消化。

细胞凋亡的主要特征是发生核小体断裂, 形成大小为180~200bp特征性的梯状条带(DNA ladders), 此现象可通过电泳检测观察, 该技术能提供细胞死亡的定性分析, 是鉴定细胞凋亡最可靠的方法。常用的凋亡检测方法一般以细胞内发生的生理、生化变化为检测基础, 包括染色法、电子显微术、流式细胞计量分析、膜联蛋白检测、DNA片段裂解情况的分析、caspase酶分析等, 都具有一定的适用范围。

吖啶橙(Acridine Orange, AO)是一种荧光色素, 其激发滤光片波长488nm。阻断滤光片波长515nm。它与细胞中DNA和RNA结合量存在差别, 可发出不同颜色的荧光(即着色特异性), 这是由于DNA是个高度聚合物, 吸收荧光物质的位置较少, 发绿色荧光, 而RNA聚合度低, 能和荧光物质结合的位置多, 故发红色荧光。

溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)含有一个可以嵌入DNA堆积碱基之间的一个三环平面基团。它与DNA的结合几乎没有碱基序列特异性。在高离子强度的饱和溶液中, 大约每2.5个碱基插入一个溴化乙锭分子。当染料分子插入后, 其平面基团与螺旋的轴线垂直并通过范德华力与上下碱基相互作用。这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近, 导致与DNA结合的染料呈现荧光, 其荧光产率比游离溶液中染料有所增加。DNA吸收254nm处的紫外辐射并传递给染料, 而被结合的染料本身吸收302nm和366nm的光辐射。这两种情况下, 被吸收的能量在可见光谱红橙区的590nm处重新发射出来。溴化乙锭-DNA复合物的荧光产率比

没有结合DNA的染料高出20-30倍。

本实验中介绍的吖啶橙—溴化乙锭(AO/EB)染色法, 不受细胞类型限制, 且简便易行, 结果较为可靠(尤其适用于凋亡发生的初期), 缺点是样本不能存放, 需要立即检测。吖啶橙是一种活性染料, 死细胞与活细胞均能被染色, 而溴化乙锭只对失去膜整合特性的细胞染色, 对正常活细胞不染色。

【材料、器具和试剂】

(一) 材料: 培养的细胞材料。

(二) 器具: 荧光显微镜、显微载玻片、细胞培养用具。

(三) 试剂:

1. Alsver溶液: 葡萄糖2.05 g, 柠檬酸钠0.80 g, 氯化钠0.42 g, 用柠檬酸溶液调节pH值至7.2, 最后用蒸馏水定容至100 ml即可。

2. Ringer溶液: 氯化钙0.25g, 氯化钾0.42g, 氯化钠6.5g, 溶于1 L蒸馏水中。

3. 10mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS)(pH7.2): 在800 ml蒸馏水中溶解8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和0.24g KH_2PO_4 , 用HCl调节溶液的pH值至7.4加水定容至1L, 高压蒸气灭菌, 保存备用。

4. 0.1%吖啶橙的配制: 称取0.1 g吖啶橙, 加入10mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS) 100 ml溶解。

5. 0.1%溴化乙锭的配制: 称取0.1 g溴化乙锭, 加入10mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS) 100 ml溶解。

6. 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)溶液: 取0.1%的吖啶橙与0.1%的溴化乙锭, 按照1: 1的比例混合。

8. 吉姆萨(Giemsa)染色液原液: 配方是0.5 g Giemsa+33 ml甘油+33 ml甲醇。配制方法是: 在研钵内先用少量甘油与Giemsa粉混合, 研磨至无颗粒为止, 再将其余甘油倒入, 搅拌后56℃水浴保温2小时, 再加入甲醇, 搅匀后保存于棕色瓶中。

7. 吉姆萨(Giemsa)染色液工作液: 用 0.1M pH7.4 磷酸缓冲液稀释吉姆萨染色液原液10倍。

8. 0.3 mM维生素K₃溶液: 称取维生素K₃(亚硫酸氢钠甲萘醌, $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_2\text{NaSO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 10 mg, 溶于100 ml Ringer溶液中。

9. 0.3M的氯化钠溶液: 称取1.75 g氯化钠, 溶于100 ml Ringer溶液中。

【方法与步骤】

一、动物细胞凋亡的诱导与观察

1. 鸡血红细胞悬液的制备: 用注射器吸入1 ml的Alsver溶液后, 从鸡翼下静脉取鸡血1~2 ml, 注入刻度离心管内, 按照1: 3(V/V)加入6 ml的Alsver溶液混匀, 放入4℃冰箱内可保存3--4天。

2. 取1.5 ml鸡血红细胞悬液, 在离心机中1000 rpm离心5 min。

3. 弃上清，得到细胞沉淀，用Ringer溶液洗涤悬浮，在离心机中1000 rpm离心2 min，重复2次。
4. 将细胞取一半用100 μ l的Ringer悬浮，另一半悬浮于100 μ l的0.3 M的维生素K3溶液中，处理1 hr，诱导细胞凋亡。
5. 取上述两种溶液各50 μ l，分别加入2 μ l吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)溶液，轻轻混匀，孵育10 min，染色。
6. 分别取10 μ l染色后的悬浮细胞滴于载玻片上，加盖玻片，用荧光显微镜观察。
7. 活细胞呈现均匀的绿色，凋亡细胞凝聚的染色质呈黄色斑块，而凋亡晚期的细胞为橙色，发生核凝聚并通常裂解。

二、植物细胞凋亡的诱导与观察

1. 玉米种子用20%次氯酸钠溶液浸泡10 min消毒，清水冲洗30min，再用清水浸泡12 hr催芽。然后将种子均匀铺放在发芽盒中，覆盖一层湿润的沙子，保持湿度，置于28℃培养3~5 d，得到玉米幼苗。
2. 剪下玉米根尖1~2 cm，放入1.5ml EP离心管中，加入1 ml的300 mM的氯化钠溶液胁迫处理1 hr，诱导细胞凋亡。
3. 去除玉米根尖，用刀片和解剖针将根尖纵切开，放到干净的载玻片上。
4. 滴加1滴甲醇溶液，晾干固定。
5. 滴加2滴吉姆萨染色工作液，染色5~10 min。
6. 用吸水纸吸取多余染液，用蒸馏水清洗一次。
7. 盖上盖玻片，压片，吸干多余水分，普通光学显微镜下观察。
8. 凋亡细胞的染色质浓缩，核膜裂解，染色质分割成块状，有凋亡小体出现。

【实验结果与思考题】

1. 描述鸡血细胞试验中，诱导和未诱导细胞在吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)溶液染色后，观察现象的区别。
2. 描述玉米根尖诱导的细胞凋亡现象。
3. 简述用AO/EB法检测凋亡细胞的原理。

实验十七 染色体荧光原位杂交技术

【实验目的】

1. 了解荧光原位杂交的基本原理和意义。
2. 掌握植物染色体的免疫荧光原位杂交的基本条件、方法和步骤。

【实验原理】

DNA分子原位杂交技术(*in situ hybridization*)是本世纪60年代末出现的一种将DNA序列或基因直接定位在染色体上的技术。其基本原理是两条核苷酸单链片段,在适宜的条件下,能过氢键结合,形成DNA-DNA、DNA-RNA或RNA-RNA双键分子的特点,应带有标记的(有放射性同位素,如 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、荧光素生物素、地高辛等非放射性物质)DNA或RNA片段作为核酸探针,与组织切片或细胞内待测核酸。(RNA或DNA)片段进行杂交,然后可用放射自显影等方法予以显示,在光镜或电镜下观察目的mRNA或DNA的存在与定位;用原位杂交术,可在原位研究细胞合成某种多肽或蛋白质的基因表达。此方法有很高的敏感性和特异性,可进一步从分子水平来探讨细胞的功能表达及其调节机制。已成为当今细胞生物学、分子生物学研究的重要手段。

早期的原位杂交多采用放射性标记做探针,它虽具有灵敏度高、特异性强、对各种酶促反应均无影响等诸多优点,但其检测手段采用放射自显影,时间长、分辨力差,结果往往难以分析。另外,放射性核素本身价格较高、不稳定、对操作人员有危害、废物又难以处理。基于这种原因,20世纪从80年代开始,许多研究者尝试寻找非放射性的物质来标记DNA或RNA探针及其相应的检测系统。

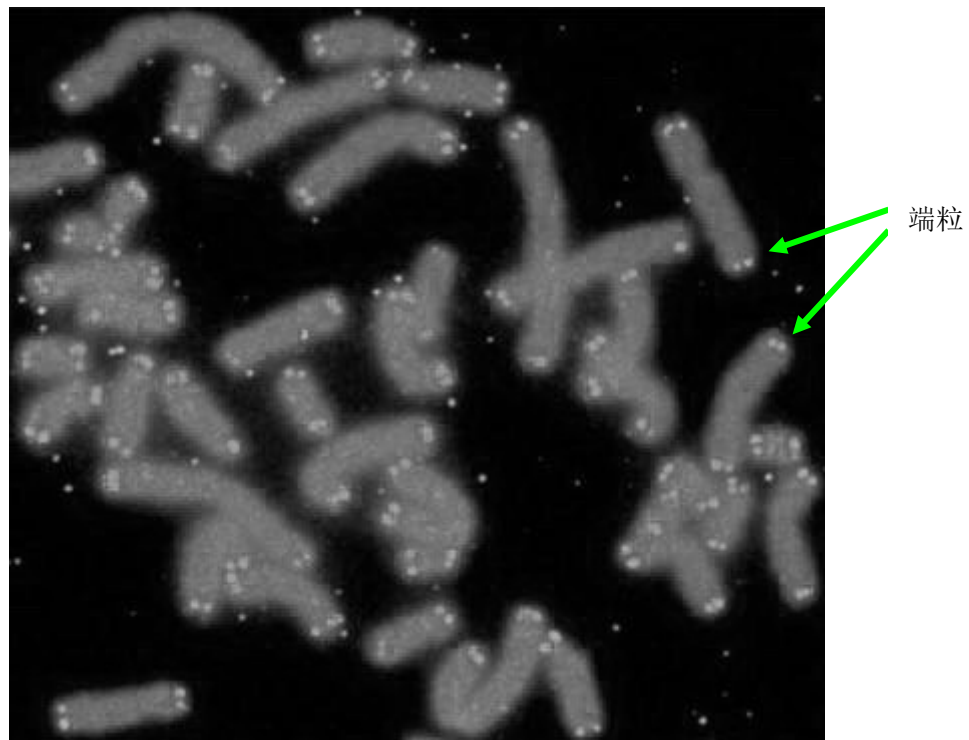


图 15 人类染色体端粒 DNA 的荧光原位杂交

荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH）是20世纪80年代末期在原有放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术。目前这项技术已经广泛应用于动植物基因组结构研究、染色体精细结构变异分析、病毒感染分析、人类产前诊断、肿瘤遗传学和基因组进化研究等许多领域。FISH的基本原理是用已知的标记单链核酸为探针，按照碱基互补的原则，与待检材料中未知的单链核酸进行特异性结合，形成可被检测的杂交双链核酸。由于DNA分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列，因而可以将探针直接与染色体进行杂交从而将特定的基因在染色体上定位。与传统的放射性标记原位杂交相比，荧光原位杂交具有快速、检测信号强、杂交特性高和可以多重染色等特点，因此在分子细胞遗传学领域受到普遍关注。

荧光原位杂交探针DNA可以用单拷贝或寡拷贝序列、物种专化DNA重复序列或基因组DNA。FISH是20世纪80年代末发展起来的一种重要的分子细胞遗传学技术。对于确定DNA序列在染色体上的相关位置和顺序是一种非常重要的工具。染色体FISH的基本过程如下：

1) 探针标记：探针标记时可采用两种基本方式：（1）直接标记法：将荧光分子直接标记于探针DNA / RNA上，杂交后可直接在荧光显微镜下检测。这种方式快速简捷、结果背景干扰很少，但杂交信号较弱、且不能进一步放大，因此，目前已较少采用。（2）间接标记法：采用一中间分子标记探针，杂交后再用荧光分子标记的中间分子的亲和物或抗体进行检测。目前采用的中间分子有：生物素、地高辛配基、2—乙酰胺氨基苄、二硝基苯酚、汞分子和巯基基团。其中前两者以标记核苷酸类似物的形式被插入探针的，因此，可以采用常规的缺口平移法、随机引物法、PCR或RNA体外转录法进行标记。标记后探针长度应为200—400bp，以保证最佳的杂交效果。

2) 染色体原位杂交：标记后的探针经变性后，加于变性的中期染色体分裂相标本上。于37℃、50%的甲酰胺2×SSC条件下进行杂交。最适的杂交条件主要取决于探针与靶基因的性质。对于单拷贝基因的杂交。特别是较长的来自基因组的序列，一般在杂交之前应进行预复性过程，标记的探针与过量的基因组DNA或Cot—1重复序列一起孵育1小时，使探针中非特异的重复序列被封闭。从而抑制该部分探针与染色体之间发生非特异性杂交，上述过程又称为抑制性染色体原位杂交。经预复性之后的探针再与变性的染色体标本杂交过夜。

3) 荧光检测：杂交结束后，标本经杂交后清洗，以去除非特异性杂交或未发生杂交的探针，然后，用荧光标记的检测试剂进行检测。对于生物素标记的探针，一般采用荧光标记的卵白素检测，对于其它中间分子，则主要采用荧光标记的相应抗体来检测。

4) 染色体显带：先进行常规显带，然后再进行FISH，会明显降低杂交信号的检出率，因此，一般显带是在杂交之后。常用的显带方法有：Actinomycin / DAPI显示的G带，经溴尿嘧啶处理后，Hoechst染色显示的R带等。采用Alu或Line重复序列与探针同时进行杂交，亦可得出R带或G带的效果。

5) 荧光显微镜检测：荧光镜检时显微镜的质量及滤片的选择，对满意结果的获得至关重要。特别是滤片系统，应严格按照荧光激发 / 发射光波长，选择最适的激发 / 阻挡滤片组

合。摄影记录系统由于固态电荷藕联扫描装置及图象分析仪的应用,可以使背景着色很大程度的减低。应用激光共轭聚焦显微镜,可通过对染色体标本的不同平面进行断层扫描,并将得到的结果经计算机处理,获得高质量的图象结果。

【材料、器具与试剂】

(一) 材料: 玉米根尖。

(二) 器具: 离心机、PCR仪、紫外分光光度计、染缸、恒温水浴、烘箱、杂交炉、荧光显微镜, 载玻片, 盖玻片, 吸水纸, 镊子, 刀片, 滴管, PCR管, 移液器, 烧杯, 温度计。

(三) 试剂:

1. 3%柠檬酸: 称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 3.0 g, 溶于100 ml蒸馏水中, PH2.0左右。
2. 2×SSC: 称取氯化钠17.6 g, 柠檬酸三钠($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 分子量294) 8.8 g, 溶解定容于1000ml蒸馏水中。
3. 0.5×SSC: 300 ml蒸馏水加100 ml 2×SSC即可(1: 3)。
4. 0.2×SSC: 270 ml蒸馏水加30 ml 2×SSC即可(1: 9)。
5. 20%甘油: 20 ml甘油加80 ml蒸馏水即可。
6. 0.5M TBS: 1000 ml蒸馏水加氯化钠30 g, Tris 1.2 g, 纯乙酸0.4~0.5 ml, PH7.2~7.6。
7. 0.01M TBS(pH9.0~9.5): 称取NaCl 9.0 g, Tris 1.2 g, 溶解于蒸馏水中, 定容至1000 ml。
8. 铬酸洗液: 称取5 g重铬酸钾, 溶于100 ml的80%浓硫酸中。
9. 1%秋水仙素: 称取1 g秋水仙素, 溶解在100 ml蒸馏水中, 4℃避光保存。
10. 卡诺固定液: 无水乙醇: 冰醋酸(3: 1)混合液。
11. 10×纤维素酶果胶酶缓冲液: 40 mM柠檬酸, 60 mM柠檬酸三钠。
12. 2%纤维素酶果胶酶混合液: 取10 ml的10×酶缓冲液, 称取纤维素酶1.0 g、果胶酶1.0 g, 溶于蒸馏水中, 定容至100 ml。
13. 4%多聚甲醛固定液: 称取4.0 g多聚甲醛(pamfomaldehyde), 70℃水浴, 溶于蒸馏水中, 定容至100 ml。
14. RNase A: 10 mg/ ml RNase A, 10 mM Tris-HCl (pH值为7.5), 15m M的NaCl。
15. 10% SDS: 称取10 g SDS, 溶于蒸馏水中, 定容至100 ml, 室温保存。
16. 蛋白酶K: 直接从生物公司购买, 配制1 μg/ μl水溶液, -20℃储存。
17. 葡聚糖硫酸酯(dextran sulphate): 购于生物公司。
18. 甲酰胺: 购于生物公司。
19. 剪切的鲑鱼精DNA: 购于生物公司。
20. 系列乙醇: 70%、95%、无水乙醇。
21. 18S rDNA探针序列。由玉米基因组DNA经特异性PCR扩增、纯化而得。
22. Nick Translation Kit荧光标记试剂: 从生物公司购买。

【实验步骤】

一、实验前载玻片和盖片的处理

玻片包括盖片和载片应用铬酸溶液浸泡24 hr, 自来水冲洗6 hr以上, 蒸馏水清洗3次, 95%酒精中浸泡24h后, 蒸馏水冲洗、烘干, 烘箱温度最好在150℃或以上过夜以去除任何RNA酶。盖玻片在有条件时最好用硅化处理, 锡箔纸包裹无尘存放。

二、染色体标本制备

1. 玉米种子用20%次氯酸钠溶液浸泡10 min消毒, 清水冲洗30min, 再用清水浸泡12 hr催芽。然后将种子均匀铺放在发芽盒中, 覆盖一层湿润的沙子, 保持湿度, 置于28℃培养3~5 d, 得到玉米幼苗。

2. 实验开始前, 加入0.1% 秋水仙素, 对玉米幼苗处理10~12 h, 使玉米根尖细胞周期同步化在细胞分裂中期。

3. 剪下玉米根尖1~2 cm, 放入1.5ml EP离心管中, 加入1 ml的卡诺固定液处理30min。

4. 随后倒掉固定液, 加入2%纤维素酶和果胶酶混合酶液, 酶解2h。

5. 倒掉酶液, 加入1 ml的70%乙醇备用。

6. 去除根尖, 放置在干净的载玻片上, 滴加1滴45%醋酸溶液, 加盖玻片, 压片, 使细胞充分铺展开。

7. 相差显微镜下观察, 选择理想的制片, 液氮速冻5 min, 取出后迅速揭去盖玻片, 稍干, 滴加70%、95%、无水乙醇系列脱水, 气干, 于-20℃保存备用。

三、探针标记

1. 探针标记采用直接标记方式, 根据Nick Translation Kit, 取PCR管, 建立如下反应体系:

0.2 mM FITC-dUTP	2.5 μ l
0.1 mM dTTP	5.0 μ l
dATP+dGTP+dCTP(各0.1mM)	10 μ l
10 $\times$ Buffer	10 μ l
Nick Translation Enzyme	10 μ l
待标记的探针DNA	1.0 μ l
无核酸酶纯水	补至总体积为50 μ l

2. 将PCR反应管稍离心, 于PCR仪内15℃反应8~16 h, 后于70℃ 30 min进行酶灭活。

3. 加100 μ l无水乙醇, 于-20℃沉淀2 h, 12000 rpm离心5 min, 弃上清液, 得沉淀。

4. 将沉淀风干, 加入30 μ l去离子水, 溶解沉淀。紫外分光光度计测定探针浓度后, 于-20℃保存备用。

四、染色体标本的杂交前处理

1. RNase处理: 每张载玻片于标本处加100 μ l 的RNase A溶液(100 μ g/ml, 2 $\times$ SSC配制), 放置于铺湿润滤纸的盒中, 37℃恒温水浴1h。

2. 用2 $\times$ SSC溶液漂洗2次, 每次5 min。

3. 于37℃条件下, 用蛋白酶K(1 μ g/ μ l)消化处理10 min。

4. 用4%多聚甲醛固定10 min。
5. 载玻片标本依次经过70%乙醇、95%乙醇、无水乙醇系列脱水，风干备用。

五、原位杂交过程

1. 配制杂交液：10%葡聚糖硫酸酯，0.1% SDS，50%甲酰胺， $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 剪切鲑鱼精DNA， $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 探针。
2. 杂交液变性：将杂交液于沸水中处理10 min，取出后迅速放入冰水中处理10 min。
3. 染色体预变性：将染色体标本上滴加70%甲酰胺/ $2\times$ SSC溶液，处理2 min，取出后风干。
4. 每张载玻片于标本处加 $20\text{ }\mu\text{l}$ 杂交液，加上盖玻片，盖玻片四周以橡皮泥封闭，放置于湿盒中， 85°C 烘箱内变性处理15 min，然后转移至杂交炉内， 37°C 杂交16 h。

六、杂交后洗脱

1. 取出杂交后的载玻片片，去除橡皮泥，揭去盖玻片，迅速放入 $0.4\times$ SSC/0.3%NP-40洗脱液中(使用前于 73°C 水浴预热30 min以上)，搅动1~3 s，于 73°C 下静置2 min。
2. 取出载玻片，放入 $2\times$ SSC/0.1%NP-40(室温)洗脱液中，搅动1-3 s，室温静置50~60 s，黑暗处风干。
3. 加 $10\text{ }\mu\text{l}$ 的DAPI染料(4, 6-二氨基-2-苯基吡啶，100 ng/ml，由抗荧光消退试剂配制)，加盖玻片，盖玻片四周以橡皮泥封闭，室温黑暗处理3 h， -20°C 黑暗处保存。

七、显微镜下观察

1. 首先选用BP270-400/BP410-580滤光片系统观察，染色体发出蓝色荧光(DAPI发射的荧光)。
2. 再用BP450-490/BP525滤光片系统观察，染色体上发出绿色荧光(FITC发射的荧光)处即为杂交位点，可显示18S rDNA在染色体上的分布状况。

备注：实验材料的固定

原位杂交在固定剂的选择上应兼顾到三个方面：保持细胞结构，最大限度地保持细胞内DNA或RNA的水平；使探针易于进入细胞或组织。DNA是比较稳定的，RNA却非常容易被降解。因此，对于DNA的定位来说，固定剂的种类和浓度并不十分重要。相反，在RNA的定位上，如果要使RNA的降解减少到最低限度，那么，不仅固定剂的种类浓度和固定的时间十分重要，而且取材后应尽快予以冷冻或固定。

各种固定剂均有各自优缺点，如沉淀性(Precipitating)固定剂：酒精/醋酸混合液、Bouin's液、Carnoy's液等能为增加核酸探针的穿透性提供最佳条件，但它们不能最大限度地保存RNA，而且对组织结构有损伤。戊二醛能较好地保存RNA和组织形态结构，但由于和蛋白质产生广泛的交叉连接，从而大大地影响了核酸探针的穿透性。

多聚甲醛是FISH较为理想的固定剂。多聚甲醛不会与蛋白质产生广泛的交叉连接，因而不会影响探针穿透入细胞或组织。对于mRNA的定位，我们常采用的方法是将组织固定

于 4%多聚甲醛磷酸缓冲液中 1~2h，在冷冻前浸入 15%蔗糖溶液中，置 4℃冰箱过夜，次日切片或保存在液氮中待恒冷箱切片机或振荡切片机切片。组织也可在取材后直接置入液氮冷冻，切片后才将其浸入 4%多聚甲醛约 10min，空气干燥后保存在-70℃。如冰箱温度恒定，在-70℃可保存数月之久不会影响杂交结果。

【实验结果与思考题】

1. 染色体荧光原位杂交的原理是什么？
2. 原位杂交技术中，探针的标记方式有哪两种？
3. 简述染色体荧光原位杂交的基本过程如何？

附录 1 细胞生物学实验室守则

实验室纪律

1. 穿着要整洁，要穿白大褂。
2. 实验室内禁止吃食物，勿高声谈话及随便走动。
3. 实验前必须认真预习，熟悉实验的内容，了解所用的仪器用具，实验中应严格按操作规程进行，认真操作、仔细观察，及时记录实验现象及结果；实验结束后仔细地分析和总结实验结果，认真做好每一天的实验报告。
4. 实验器具应保持清洁，任何例用过的器具及玻璃器皿必须洗净后放回原处。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障立即报告，不得擅自拆检。
5. 实验台面应随时保持整洁，仪器、药品摆放整齐。公用试剂及用具盒用完后，应立即盖好放回原处。
6. 执行值日生制度，每天安排 3-4 人值日，其职责是负责实验器具的整理、操作台、水槽、地板等实验室卫生工作和一切服务性工作，并注意实验室的水、电、门窗等方面情况。

实验须知

1. 每个学生必须遵守实验室规则。
2. 实验时不准迟到、早退或无故缺席，有病或有事需向任课教师请假。
3. 进入实验室后要保持安静，不得在室内喧哗、打闹；不得抽烟、吃东西、随地吐痰、乱丢纸屑和其他杂物。
4. 不得将与实验无关的物品带入实验室；不得将实验物品带出实验室；不允许在实验台和仪器上乱涂乱画，未经许可不得操作、搬弄仪器设备。
5. 要爱护仪器、设备和标本，使用仪器要小心，严格遵守操作规程，因违反操作规程而损坏仪器设备及物品者要按有关规定赔偿。
6. 在实验过程中仪器设备发生故障或损坏时，应首先切断电源，并立即报告任课教师及时处理。
7. 使用贵重仪器设备，一定要在老师的指导下操作，使用完毕，要进行登记。
8. 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂及传染性强的物品时，应严格操作，注意自我保护。如发生意外应立即报告任课教师，及时处理。
9. 实验完成后，将仪器设备、用具等放归原处，所用器皿清洗干净。值日生负责清扫室内卫生，关好水、电开关和窗户，经任课教师检查后，方可离开实验室。

注意事项

1. 实验前应做好试剂的配置，用品灭菌等准备工作，配置分子生物学实验各种试剂，必须要使用重蒸水（ddH₂O）
2. 使用后的器皿必须认真清洗干净，洗完后还要用重蒸水冲洗三次。
3. 凡是可以进行灭菌的试剂与用具都必须经过高压蒸汽灭菌后进行使用，防止其他杂质或酶对 DNA、RNA 或蛋白质的降解。
4. 凡是基因工种操作所用的一切塑料器具（eppendorf 管、tip 等），在使用前都应装入盒子和瓶子中灭菌，且装盒或装瓶过程中都应采用镊子或戴上一次性手套进行操作，不能直接用手去拿，严防手上杂酶污染。
5. 对于 eppendorf 管、tip 与非玻璃离心管等只能湿热灭菌，然后置在 50℃温箱中烘干后使用。
6. 实验带上一一次性手套，手套用完后捆好再弃于废物缸。
7. eppendorf 管、tip 为一次性用品，用完后再弃于废物缸。
8. 实验中加入任何试剂后应注意样品的混匀，保温等反应后样品也应离心甩一下后再进行下步的实验。
9. 限制性内切酶等工具酶在 50%和甘油中和-20℃下可长期保存。使用时应至始至终将酶保持在零度以下，取酶时不能用手指接触储存酶的部分。在需要加酶时将酶从冰箱中取出，放在冰盒里，用完后立即放回去冰霜。
10. 实验过程中应做好每个样品的标记工作，且一般在 Eppendorf 管上用记号笔作标记时，应在两处重复做好标记。
11. 微波炉内不可使用金属容器以及空载。
12. 使用离心机要注意离心样品的平衡。

附录 2 细胞生物学染色技术

由于细胞含有大量水分（一般在 80-90%以上），对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大，与周围背景没有明显的明暗差。所以，除了观察活体细胞的运动性和直接计算细胞数外，绝大多数情况下都必须经过染色后，才能在显微镜下进行观察。但是，任何一项技术都不是完美无缺的。染色后的标本是死的，在染色过程中细胞的形态与结构均会发生一些变化，不能完全代表其生活细胞的真实情况，染色观察时必须注意。

一、染色的基本原理

细胞染色的基本原理，是借助物理因素和化学因素的作用而进行的。物理因素如细胞及细胞物质对染料的毛细现象、渗透、吸附作用等。化学因素则是根据细胞物质和染料的不同性质而发生地各种化学反应。酸性物质对于碱性染料较易吸附，且吸附作用稳固；同样，碱性物质对酸性染料较易于吸附。如酸性物质细胞核对于碱性染料就有化学亲和力，易于吸附。但是，要使酸性物质染上酸性材料，必须把它们的物理形式加以改变（如改变 pH 值），才利于吸附作用的发生。相反，碱性物质（如细胞质）通常仅能染上酸性染料，若把它们变为适宜的物理形式，也同样能与碱性染料发生吸附作用。另外细胞膜的通透性、膜孔的大小和细胞结构完整与否，在染色上都起一定作用。

二、染料种类和选择

染料分为天然染料和人工染料两种。天然染料有胭脂虫红、地衣素、石蕊和苏木素等，它们多从植物体中提取得到，其成分复杂，有些至今还未搞清楚。目前主要采用人工染料，也称煤焦油染料，多从煤焦油中提取获得，是苯的衍生物。多数染料为带色的有机酸或碱类，难溶于水，而易溶于有机溶剂中。为使它们易溶于水，通常制成盐类。

染料可按其电离后染料离子所带电荷的性质，分为酸性染料、碱性染料、中性（复合）染料和单纯染料四大类。

1、酸性染料：这类染料电离后染料离子带负电，如伊红、刚果红、藻红、苯胺黑、苦味酸和酸性复红等，可与碱性物质结合成盐。

2、碱性染料：这类染料电离后染料离子带正电，可与酸性物质结合成盐。一般常用的碱性染料有美兰、甲基紫、结晶紫、碱性复红、中性红、孔雀绿和蕃红等。

3、中性（复合）染料：酸性染料与碱性染料的结合物叫做中性（复合）染料，如瑞脱氏（Wright）染料和基姆萨氏（Gimsa）染料等，后者常用于细胞核的染色。

4、单纯染料：这类染料的化学亲和力低，不能和被染的物质生成盐，其染色能力视其是否溶于被染物而定，因为它们大多数都属于偶氮化合物，不溶于水，但溶于脂肪溶剂中，如紫丹类（Sudanb）的染料。

三、制片和染色的基本程序

细胞的染色方法很多，各种方法应用的染料也不尽相同，但是一般染色都要通过制片及一套染色操作程序。

- 1、取样：根据研究的对象，选择合适的实验材料，获取对应部位的细胞、组织或器官作为标本。
- 2、固定：标本首先进行固定，固定的目的是：杀死细胞，固定细胞结构。改变染料对细胞的通透性，因为死的原生质比活的原生质易于染色。对于微生物，固定常常利用高温，手执载玻片的一端（涂有标本的远端），标本向上，在酒精灯火焰外层尽快的来回通过 3-4 次，共约 2-3 秒钟，并不时以载玻片背面加热触及皮肤，不觉过烫为宜（不超过 60℃），放置待冷后，进行染色。对于动物和植物细胞，应采用化学固定法。化学固定法最常用的固定剂有：酒精（95%），酒精和醚各半的混合物，丙酮，1-2%的饿酸等。饿酸能很快固定细胞但不改变其结构，故较常用。
- 3、染色：标本固定后，滴加染色液。染色的时间各不相同，视标本与染料的性质而定，有时染色时还要加热。染料作用标本的时间平均约 1-3min，而所有的染色时间内，整个涂片（或有标本的部分）应该浸在染料之中。
- 4、脱色：用醇类或酸类处理染色的细胞，使之脱色。可检查染料与细胞结合的稳定程度，鉴别不同种类的细胞。常用的脱色剂是 95%酒精和 3%盐酸溶液。
- 5、复染：脱色后再用一种染色剂进行染色，与不被脱色部位形成鲜明的对照，便于观察。革氏染色在酒精脱色后用番红，石碳酸复红最后进行染色，就是复染。
- 6、水洗：染色到一定的时候，用细小的水流从标本的背面把多余的染料冲洗掉，被细胞吸附的染料则保留。
- 7、干燥：着色标本洗净后，将标本晾干，或用吸水纸把多余的水吸去，然后晾干或微热烘干，用吸水纸时，切勿使载玻片翻转，以免将细胞样品擦掉。
- 8、镜检：干燥后的标本可用显微镜观察。

综上所述,染色的基本程序如下:制片→固定→染色→脱色→复染→水洗→干燥→镜检。

附录3 生物绘图与临时装片知识

一、生物绘图的要求

- 1.具有高度的科学性，不得有科学性错误。形态结构要准确，比例要正确，要求真实感，立体感，精美而美观。
- 2.图面要力求整洁，铅笔要保持尖锐，尽量少用橡皮。
- 3.绘图大小要适宜，位置略偏左，右边留着注图。
- 4.绘图的线条要光滑、匀称，点点要大小一致。
- 5.绘图要完善，字体用正楷，大小要均匀，不能潦草。注图线用直尺画出，间隔要均匀，且一般多向右边引出，图注部分接近时可用折线，但注图线之间不能交叉，图注要尽量排列整齐。
- 6.绘图完成后在绘图纸上方要写明实验名称、班级、姓名、时间，在图的下方注明图名及放大倍数。

二、生物绘图的方法

绘图前认真的观察标本，搞清实物标本的结构特点，切忌抄书或平空想象。用 HB 铅笔轻轻将图轮廓画出，作为草图要掌握好比例和位置。在草图的基础上绘详图，此时要用 2H 和 3H 铅笔，线条要流畅，点要匀称，点线不要重复描绘。生物绘图的方法有多种，最常见的是点点衬阴法：将图形画出后，用铅笔点出圆点，以表示明暗和深浅，给予立体感。在暗处点要密，明处要疏，但要求点要均匀，点点要从明处点起，一行行交互着点。点点衬阴法要求不能用涂抹阴影的方法以代替点点，此点初学者要尤为注意。

三、临时装片的方法

对于某些新鲜而柔嫩的材料，不用刀切，仅进行简单处理即可进行观察的方法。这种方法制成的标本可以保持材料的生活状态和天然的色彩，一般多作为临时观察使用。常用方法有：

1、涂片法：主要用于血液、精液、尿、痰、微生物等无固定组织结构的样品。取一干净载玻片，将一滴待观察样品滴在载玻片左侧，用另一干净载玻片的窄边接触样品。此时液态样品沿两载玻片接触处展成一细线，迅速将上边载玻片以 45 度角向右侧推动，即在第一张载玻片上形成一薄层样品膜，可自然风干待用。

2、铺片法：主要用于动、植物组织的表皮层观察。可活体取待观察的动、植物组织，用尖头镊撕去一小块表皮，迅速平铺在载玻片的水滴上（也可用染剂），用盖玻片盖上，避免气泡，除去多余水分，即可观察。

植物材料临时装片的制作方法：擦净载玻片和盖玻片，即将浸洗过的玻片用纱布擦干，擦盖玻片时，应十分小心。用玻璃滴管吸水，滴一滴在载玻片的中央。用镊子或毛笔挑选小而薄的材料放置于载玻片上的水滴中。加盖片：右手持镊子，轻轻夹住盖玻片，使盖玻片边缘与材料左边水滴的边缘接触，然后慢慢向下落，方平盖玻片。这样可使盖玻片下的空气逐

渐被水挤掉，以免产生气泡。如果盖玻片下的水分过多，则材料和盖玻片容易浮动，影响观察，可用吸水纸条从盖玻片的侧面吸去一部分水。如果水未充满盖玻片时，容易产生气泡，可从盖玻片的一侧再滴清水将气泡驱走，即可进行观察。

3、压片法：一些幼嫩、柔软的材料可将其置于载玻片上，加染液一滴，再盖上盖玻片，用拇指垂直用力挤压，使组织散成一薄片，再进行观察。如植物根尖观察染色体，花粉观察发育阶段等。

4、整装片法：一些个体微小的原生动物或藻类，如水螅、线虫、四膜虫、衣藻、团藻等，可整体将其置于载玻片的水滴中，盖上盖玻片观察。

附录 4 实验报告的书写

实验报告是对实验观察、比较后所得结果的真实记载，是科学的记录。实验报告的形式可以根据实验内容的不同而分为文字描绘、绘图和列表 3 种形式。

1、文字描绘：文字描绘是将观察或实验所得结果客观地加以描绘，有时还需要做进一步分析。在此过程中，要抓住主要问题，描绘准确，条理清楚，文字简明。

2、绘图：将所观察标本的形态结构或显微镜下观察视野图通过作图的方式来表达。（1）准备 1 支 3H 和 1 支 HB 黑铅笔及橡皮、直尺、绘图纸和削笔刀。绘图必须真实准确，注意整洁明了。不可抄袭教材或他人的图。（2）图的各部分比例应与标本或图像一致，在绘图纸的一面绘图，每幅图的大小、位置必须分配适宜，布局合理。一般较大的图每页绘 1 个，较小的图每页绘数个。（3）图的位置一般偏于纸的左侧，右侧作引线及注字。（4）绘图时，先用中性铅笔(HB)把标本轮廓及主要部分轻轻绘出，然后添加各部分详细结构，再加以修改，最后用尖的硬铅笔(3H)以清晰的笔画绘出全图。（5）绘图纸上所有的字必须用硬铅笔以楷书写出，不可潦草。注字引线应水平伸出，各引线不能交叉，图的名称应写在图的下面。

3、制表：表格通常是简洁、准确、有条理地表示数值型数据的合适方式，它能有效地压缩和展示实验结果，并有助于详尽地对数据进行比较。表格包括的内容如下。标题：必要时写上参考标注和日期。行和列的表头：附上合适的测量单位。将相关数据或特性按类别垂直列出，用行展示不同的实验处理、生物类型等。对照值常放在表格的开头，相互比较的列要靠在一起。数据值：引用有意义的有效数字，根据需要列出统计参数。脚注：解释缩写符号、修饰符号及单个细节。

4、回答与实验相关的思考题，巩固对实验原理，实验现象的理解和认识。

参考资料

1. 《细胞生物学实验》(第二版), 杨汉民, 北京: 高教出版社, 2005
2. 《细胞生物学实验指导》, 李素文, 北京: 高教出版社, 2004
3. 《细胞生物学实验》, 李玲、李雪峰编著, 湖南科学技术出版社, 2003
4. 《细胞生物学实验教程》, 王金发、何炎明主编, 科学出版社, 2004
5. 《细胞生物学实验》, 辛华主编, 科学出版社, 2001
6. 《细胞生物学实验原理与技术》, 姜静主编, 东北林业大学出版社, 2004
7. 《分子细胞生物学》, 韩贻仁主编, 科学出版社, 2001
8. 《细胞分子生物学实验操作指南》, 郭葆玉主编, 安徽科学技术出版社, 1998
9. 《细胞生物学》, 翟中和主编, 高等教育出版社, 2000
10. 《细胞生物学》(第二版), 汪堃仁主编, 北京师范大学出版社, 1998
11. 《细胞生物学》(第二版), 郑国锷主编, 高等教育出版社, 1992
12. 《细胞生物学研究方法与技术》(第二版), 刘鼎新, 北医、协和医大联合出版社, 1997