

生命科学实验指南系列

精编细胞生物学实验指南

Short Protocols in Cell Biology

〔美〕J.S.博尼费斯农 等 著

章静波 方 瑾 王海杰 谭玉珍 主译
陈实平 陈誉华 张钦宪 陈克铨 主校

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书内容翔实全面,主要包括:细胞培养、细胞的制备与分离、亚细胞组分分离和细胞器分离、抗体、显微镜技术、细胞蛋白质的特性、电泳与免疫印迹、蛋白标记和免疫沉淀、蛋白质的磷酸化作用、蛋白质转运,以及细胞增殖、衰老和死亡、体外重建、细胞黏附和细胞外基质、细胞的能动性、细胞器运动。全书还附有各种实用信息和数据,包括试剂与溶液的配制、细胞生物学研究中常用的药物概要和各种常用技术的介绍等。

原书名:Short Protocols in Cell Biology.

Copyright©2003 by John Wiley & Sons, Inc.

All rights reserved. Authorized translation from the English language edition by John Wiley & Sons, Inc.

图书在版编目(CIP)数据

精编细胞生物学实验指南/(美)J.S.博尼费斯农等著;章静波等译.—北京:科学出版社,2007

(生命科学实验指南系列)

ISBN 9787-03-017579-4

I. 精… II. ①博…②章… III. 细胞生物学-实验-指南 IV. Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第073984号

责任编辑:李悦 彭克里 刘晶/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/封面设计:王浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2007年1月第一次印刷 印张:54 1/4

印数:1—3 000 字数:1 242 000

定价:120.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

译校者名单

译者 章静波（中国协和医科大学基础医学院）
董敏（中国医学科学院基础医学研究所）
王艳辉（中国医学科学院基础医学研究所）
熊伟鹏（中国医学科学院基础医学研究所）
陈实平（中国医学科学院基础医学研究所）
冯若（郑州大学医学院）
刘书漫（郑州大学医学院）
崔景彬（郑州大学医学院）
陈鲤翔（郑州大学医学院）
朱自强（中国医学科学院基础医学研究所）
刘伟（中国医学科学院基础医学研究所）
王艾琳（北华大学医学院）
安倍莹（北华大学医学院）
曲莉（北华大学医学院）
宋艳（北华大学医学院）
赵永娟（中国医学科学院基础医学研究所）
方瑾（中国医科大学基础医学院）
张惠丹（中国医科大学基础医学院）
赵伟东（中国医科大学基础医学院）
陈澄（中国医科大学基础医学院）
王海杰（复旦大学上海医学院）
谭玉珍（复旦大学上海医学院）
王莎丽（中国医学科学院基础医学研究所）

审校者 陈克铨（中国协和医科大学基础医学院）
陈实平（中国医学科学院基础医学研究所）
章静波（中国协和医科大学基础医学院）
张钦宪（郑州大学医学院）
刘伟（中国医学科学院基础医学研究所）
朱自强（中国医学科学院基础医学研究所）
方瑾（中国医科大学基础医学院）
陈誉华（中国医科大学基础医学院）

译者序

细胞生物学的重要性及其在生命科学中的重要地位已被科学家们所公认。2002年第6916期 Nature (《自然》) 杂志的封面上赫然写着“Cell Biology is a Big Science”(细胞生物学是一门大学科)。为什么细胞生物学是个大学科呢? 因为它是包括医学在内的一切生命学科的基础, 它所研究的对象——细胞是生命的基础, 无论单细胞生物还是多细胞生物, 细胞的活动往往代表着或是牵动着整个机体的状况。因此早在1925年, 细胞生物学研究的先行者 E. B. Wilson 便在他不朽的著作《细胞的发育与遗传》(The Cell in Development and Heredity) 中指出“每一个生物学问题的关键最终必然从细胞中去寻求”(The key to every biological problem must finally be sought in the cell)。

自1665年 Robert Hooke 第一次发现细胞以来, 人们对细胞的研究从未间断过, 而且研究细胞的兴趣与日俱增。但是直到20世纪50年代, 细胞生物学的研究还基本停留在细胞的形态、结构、组成的层面上。虽然在此期间细胞生理学、细胞遗传学、细胞化学等分支学科均已发展和建立起来, 但只有在分子生物学兴起之后, 才真正将细胞生物学抛向了一个更高的层面, 诞生了细胞生物学。

如今, 细胞生物学的研究范围更加广泛, 研究层次更加深入, 几乎涉及机体的一切生命现象, 如生长、发育、变异(尤其是癌变)、疾病与死亡(尤其是细胞凋亡)等。同时, 它又深入到分子、亚细胞的层面, 将细胞与整体的研究相结合。为此, 不少相关学科的研究者参与到细胞生物学的研究中来, 无怪乎近年来不少诺贝尔奖授予了与细胞生物学研究相关的学科。例如, 1999年授予细胞内信号系统的研究, 2001年授予细胞周期的研究, 2002年授予细胞凋亡的研究, 2003年授予与细胞通道有关的研究, 2006年授予RNA干扰的研究等。

学科间的融合及相关科学家参与细胞生物学的研究不仅促进了细胞生物学的迅速发展, 而且使得细胞生物学研究方法与技术也发生了革命性的变化。我们不但可以观察固定染色的细胞, 还可以观察生活着的细胞; 不但可以研究细胞内已存在的物质成分, 还可以分析细胞内物质动态改变的代谢过程; 不仅可以研究作为一个单独实体的细胞运动, 还可以观察细胞器的运动; 不但可以研究细胞间的相互作用, 还可以研究细胞与周围环境的相互作用。所有这一切不仅使得细胞生物学成为一门大学科, 而且几乎成为研究所有其他生命科学不可或缺的工具。美国 Wiley 出版社曾编著《最新细胞学实验方法汇编》(Current Protocols in Cell Biology, CPCB)。这部方法学工具书无疑具有大而全的特点, 然而就实用性来说未免过于庞大, 于是有了精编本。精编本实用而不烦琐, 适合于所有从事细胞生物学以及将细胞生物学技术方法作为工具的其他生命学科的科研与教学人员, 尤其是初涉细胞生物学研究的莘莘学子。

迄今, 我国也已编著了不少关于细胞生物学实验技术方法指南的工具书, 它们对于推动我国细胞生物学科研与教学发挥了重要作用, 但就系统性来说与此书相比还有不小的差距, 另外本书所描述的方案步骤颇为详尽, 操作之严密性也堪称典范。翻译此书

的意义不仅在于可以引进其中的方法技术，或许这种编写与著作模式也是适合“拿来主义”的。希望不久的将来我国也能编出适合我们自己国情的更好的细胞生物学方法学书籍来。

本书译者多为从事细胞生物学或相关学科的科研教学人员，他们对本书内容比较熟悉，相信译文能忠实反映出原文的本意。然而，鉴于本书内容新，有些技术方法尚未在国内运用，因此可能有理解原文不精确之处，甚至误译，谨希望读者在使用时及时指出并予以指导。我们将以适当方法及时予以纠正，免得谬种流传，误人子弟。这也是本书译者的共同心愿。

他山之石，可以攻玉。相信译本的出版能为推动我国细胞生物学及相关学科的发展起到应有的作用。

章静波

中国协和医科大学基础医学院

前 言

细胞生物学的研究体系日益扩大。要想领略这种扩展，途径之一便是去参加本领域的重要会议，诸如美国细胞生物学学会（American Society for Cell Biology）的年会。你可以悠闲地漫步于大厅的展板区，甚至于都不必驻足于某一版面，就可以深刻感受到细胞生物学范畴之辽阔。对于那些在过去一二十年间经常光顾这种展厅的人们来说，细胞生物学的这种动态态势以及这种爆发性的发展是毫不奇怪的——在愈来愈多的研究体系中只能是愈来愈多。以往展板区域主要由细胞的画面主宰，这些细胞都经由电子显微镜学家的固定（很呆板地），并且只是以黑白两色显示出来。虽然电子显微镜目前对于我们了解细胞构筑仍然有贡献，但新近展板区已出现一排排活细胞的电脑增晰视频影像（computer-enhanced video images），这些细胞均经过不完全活性染色才显示，诸如罗丹明红（rhodamine red）、荧光素绿（fluorescein green）以及被称作绿色荧光蛋白的特异绿色等。冰冻蚀刻的加入则以冷冻定帧法（freeze frame）来展现细胞。此外在视频影像间还散在有另一些展板，它们详细记录了众多细胞成分分子特征。还有一些展板报道了用基因削减或基因敲除显示的有关它们功能的新近发现。正如罗盘的星点有其应有的位置一样，酵母、果蝇和蠕虫的遗传学研究兴旺于一方，而在细胞生物学基础研究和临床医学之间架设桥梁的研究也在另一方不断地涌现。

很显然，今天称自己为细胞生物学家的科学家乃是一个多学科群体，这种多学科性质隐藏着巨大的学术价值。那些曾经将研究学科分隔开来的边界如今已逐渐消失，细胞生物学家也已赞同没有哪一种单独的途径可以揭开细胞的奥秘。新技术和新技术学随着试验成真并肩而至，并且用作细胞生物学在本领域开拓的工具。正是细胞生物学的这一面目的变化以及其代表巨大挑战的方法学共同促成了《精编细胞生物学实验指南》的问世。本书要阐述的一个基本问题是，在细胞生物学领域里应在何处划出其边界。我们的决定是拒绝划出这种边界，因为它们完全是人为的，并且，糟糕的是，会产生反效果。相反，我们企图努力弥合该领域的多样性。本指南要包括那些对细胞生物学家仍有价值的“经典的”方法，也要提供旨在成为今后之经典的程序。

我们没有理由怀疑细胞生物学的研究领域随时都会很快地停滞。事实上，一名细胞生物学家之所以激励不已，部分地出于革新和新发现所带来的不间断的惊奇。为此，我们这一专业需要一些可靠的、便于使用的，而且还要反映出该领域扩展的实验方法学的资料。为了符合这一要求，我们收集了覆盖细胞生物学众多方面的一系列实验方案，虽然这一套方案还不完全，但可以认为它是一个“初学者工具箱”，包括有许许多多我们这一专业中最常用和必需的工具。

《精编细胞生物学实验指南》所提供的是发表于《最新细胞生物学实验方法汇编》（Current Protocols in Cell Biology, CPCB）中那些方法的精编本。我们的这一精编本是从原著“核心”手册以及季度新资料汇编抽取其精粹所构成的，包括CPCB新涵盖的主要方法，并一步一步地予以描述。为了适用于实验室，精编本的设计为流线型版式，

这与 CPCB 不同。这本精编本的内容也足够详细，研究人员可将其看作是独立的实验室指南。若想得到更多的信息和相关的讨论，我们推荐读者去参阅 CPCB 中的评述和详细的注释。

虽然掌握书中的技术可以使得读者从事细胞生物学及相关领域的研究，但无论是指南或是 CPCB，并不意图取代细胞生物学研究生水平的课程或是作为本领域中的完整教科书。此外我们极力主张读者们要向你身边那些富有经验的研究人员学习，以取得第一手经验。

如何使用本指南

结构

本指南中的主题是按章编排的，其中的方案插入每章各单元中。所谓“单元”，一般是描述一种方法，它们通常包括有一个或更多的方案，其中有材料、步骤和对每一技术的注释。在指南中，有关材料的描述顺序和结构与《最新细胞生物学实验方法汇编》不完全相同。各章均重新安排、重编序号，在某些情况里还有相互交融。各章中的单元也重新作了安排，但每章和每单元的题目基本上还是与 CPCB 相一致的。对于那些翻阅这两部实验指导的读者，当他们需要更多的解释和评述时，将会发现很容易在这两本书中找出相应的单元。

整个指南中所提到的许多试剂和步骤都是反复应用的，因此在各单元间我们广泛使用了相互参照，而不重复描述步骤。相互参照可确保那些冗长的和复杂的方案变得不那么烦琐，它只是描述准备新材料和分析结果的那些辅助步骤。某些描述常用技术和配制的单元（如凝胶电泳、离子交换层析、免疫印迹、放射自显术），则可与描述它们应用的其他单元相互参照。因此分离或鉴别蛋白条带时，便可相互参照第 7 章中（描述凝胶电泳的各个步骤）某个单元（也就是单元 7.1）。对于某些广泛使用的技术（如透析），读者又可参考附录 3。对于那些分子生物学和蛋白质生物学常用的方法，读者可参考《最新分子生物学实验方法汇编》（Current Protocols in Molecular Biology）和《最新蛋白质科学实验方法汇编》（Current Protocols in Protein Science）或它们的精编本。

本指南有四则附录，每一种方法中所用的试剂和溶液的配制及特别标注者可见附录 1，其余附录包括有用的量度和资料（附录 2）、常用的实验技术（附录 3）以及供应商的名号和地址（附录 4）。

方案

指南中的许多单元包括多种方案，每一种方案描述一系列步骤。基本方案出现于每一单元之前，通常是总体推荐的或是最普遍应用的方法。备择方案乃针对采用不同设备和试剂而达到相同结果时所选用者，其原材料来自不同的途径，或者终产物不同于基本方案。支持方案所描述的是进行基本方案或备择方案所需要的那些附加步骤，这些步骤独立于核心方案，因为它们或许可以在指南的另外地方用上，或是在与基本方案步骤不相关的一定时限中进行。

试剂和溶液

方案所要求的试剂均在步骤开始之前以材料目录一一列出。许多属于普通的储存液，另一些是常用的缓冲液和培养基，还有的则为特殊方案所专用的溶液。有标记符号(√)的材料系列的配方见于附录 1。要特别注意的是，某些溶液虽然配方不同，但在不少单元里有相似的名称(如溶解缓冲液)，因此需要针对配方准备试剂。为避免混乱，除了常用的缓冲液和溶液，如 TH 缓冲液和 PBS 之外，单元(要用到配方者)的附属编目可在附录 1 中每一种试剂名下找到。

注意：除非另有说明，在本指南中所有方案中均应使用去离子蒸馏水(或相当质量的水)，并以此制备各种试剂和溶液。

设备

现代细胞生物学实验室中的各种标准设备列于附框中。这些设备在指南中被广泛应用。每一方案之前的材料目录只包括“特殊的”器材，也就是实验室中不一定备有的常规物件，或者是需要特别准备的物品。

标准的实验室设备

下列是现代细胞生物学实验室某些标准的设备——也就是在本指南中所广泛采用的。因此它们通常并不包括在每个具体的材料目录之中。我们并不意图列出每一个方案中每个步骤所需的所有材料，只是将那些在实验室不常准备的或是需要特别准备的设备列出。附录 4 提供了有关实验室设备供应商家的联系信息。

敷料品：棉头的和毛料的

高压锅

封袋机

天平：分析天平和制备天平

烧杯

桌布：塑料垫(包括蓝色小衬垫)

本生灯

离心机：低速(20 000r/min)冷冻、超速(20 000~80 000r/min)、低速大容量、台式，均装配有合适的转头和接头

离心管和瓶：各种大小的塑料、玻璃离心管和瓶夹子

圆锥形离心管：塑料和玻璃的

各种容器：用于洗凝胶和洗膜的各种塑料和玻璃的容器

玻片染色缸：玻璃的适用于 25~75mm 的载玻片

冷冻管：无菌的(如 Nunc)

比色皿

有害生物废料箱和废料袋

生物安全柜：组织培养或层流超净台；过滤空气和维持气流形式，可保护因操作者而感染细胞或者因细胞而感染操作者

瓶子：玻璃和塑料的，带喷射器的盖革计数器

干胶机

手套：一次性手套和热抗性手套

刻度量筒

加热器：恒温控制的，用于试管和微量离心管

血细胞计数器和/或电子细胞计数仪

匀浆器

加湿 CO₂ 培养箱

冰桶

制冰机

显微镜浸油

实验室外衣
干燥器和干燥剂
干冰
电泳设备：琼脂糖和丙烯酰胺，最大的和小型的电源
胶片显影系统和暗室
过滤装置
镊子
分部收集器
冰箱：-20℃，-70℃，液氮
通风橱
显微镜玻璃载片：25~27mm，以及盖玻片
带相机的显微镜：立式、倒置、荧光、相差、解剖
微量滴定板阅读仪
研钵和研杵
烤箱：干燥用烤箱和微波炉
裁纸刀：大号
纸巾
石蜡膜
巴氏吸管和球囊
实验室玻璃用品
底片灯箱
液氮
冷冻干燥机
磁力搅拌器：带和不带有加热装置，附有搅拌棒
记号笔：包括防水记号笔、中国毛笔和荧光笔
微量离心机：Eppendorf 型，最大速率在12 000~14 000r/min
离心管：0.2ml, 0.5ml, 1.5ml, 2.0ml
橡皮细胞擦或塑料细胞刮
橡皮塞子
安全眼罩
解剖刀和刀片
液体闪烁仪，β

剪刀
摇床：定轨和平台，室温或 37℃
分光光度计：可见光和 UV
真空旋转蒸发器
注射器和针头
胶带纸：不透光胶纸、电工黑胶带、高压锅胶带和 Time 胶带
试管：玻璃和塑料，不同大小规格，带有或不带有试管帽
PCR 热循环仪和试管
pH 计
pH 试纸
吸管：带刻度
移液管：可调试，0.5~10μl、10~200μl 和 200~1000μl
Polaroid 照相机或影视记录系统
电源：300V 用于聚丙烯酰胺凝胶，2000~3000V 适用于其他用途
架子：用于试管和微量离心管
射线保护屏：Lucite 或 Plexiglas
放射性液体或固体废料收集箱
冰箱：4℃
圈式铁架及配套铁圈
定时器
工具箱及常用工具
盘：塑料和玻璃的，不同大小规格
管子：橡皮和聚乙烯的
UV 灯：长波和短波
UV 透光仪
UV 透光塑料包装膜（如 Saran 保鲜膜）
真空干燥器
真空烤箱
涡旋混合器
组织捣碎机
可调温水浴箱
纯水系统
X 光片暗盒和增感屏

供应商

化学试剂、生物制品和设备的供应商名录在整个指南中均有列出。在某些情况下，名牌产品具有高质量或者它只有在商业中心有售。但也有这种情况，即限于本指南的作者经验，对有些品牌不甚了解。在后一种情况里，对于一个初级的细胞生物学实验者来说，在他们获得商业工具时，我们的推荐只能作为参考；对于有经验的研究人员则鼓励他们使用别的品牌以代替自己常用的品牌。在本指南中所提到的所有供应商的地址、电话号码、传真号码和 Web 网址均记载于附录 4。

参考文献

本精编指南只给出最基本的有限数目的参考文献，以此作为每个单元的背景。这些参考文献以缩写的形式列于每单元之后，而全部文献则列于本书之末的参考文献。所引证的特别参考文献目录，如图与表中者，也可在参考文献栏内找到。那些对方法的背景和应用想有更完全了解的读者可参阅《最新细胞生物学实验方法汇编》。

安全考虑

任何使用这些方案的研究人员均可能遇到下列有害的或潜在有害的物质：①放射性物质；②有毒化学物质和致癌的或致畸的物质；③致病的和感染性的生物制剂；④某些重组 DNA 结构。在某些单元里包括有关安全防范的陈述中，我们都强调本书使用者必须要小心谨慎，遵循良好的操作规范，要严格根据当地和国家有关规定处理所有的实验材料。

致谢

Wiley 出版社精编指南编辑部的同仁们支持和帮助我们将该课题荟萃在一起。他们是 Tom Downey, Elizabeth Harkins, Tuan Hoang, Scott Holmes, Nadine Kavanaugh, Susan Lieberman, Allen Rans, Liana Scaletter, Mary Keith Trawick 和 Kathy Morgan。我们特别感激我们的许多同事——包括我们自己实验室的同事以及全球所有有关机构和企业的同事，是他们为本指南提供了材料，并和我们分享了他们的实验程序和经验。

推荐的基本读物

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2003. *Essential Cell Biology*, 2nd ed. Garland Publishing, New York.

这是由《细胞的分子生物学》(Molecular Biology of the Cell) 的作者所撰写的一本细胞生物学导论。

2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson, J. D. 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th ed. Garland Publishing, New York.

3. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Baltimore D. and Darnell, J. 2000 Molecular Cell Biology. 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York.

这是两本完整和描述透彻的教科书，它们将生物化学、遗传学、结构生物学、传统细胞生物学有效地融会贯通起来，组成为一部现代分子和细胞生物学。

Juan S. Bonifacino, Mary Dasso,
Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-
Schwartz, and Kenneth M. Yamada

目 录

译者序	
前言	
第1章 细胞培养	1
单元 1.1 哺乳动物细胞培养的基本方法	2
基本方案 单层细胞的胰酶消化和传代	2
备择方案 悬浮培养的细胞传代	3
支持方案 1 人单层贴壁细胞的冻存	3
支持方案 2 悬浮细胞的冻存	4
支持方案 3 人细胞系的解冻与复苏	4
支持方案 4 用血细胞计数板和台盼蓝染色法测定细胞数目及活性	4
支持方案 5 细胞运输的准备	5
单元 1.2 适于哺乳动物细胞的培养基	6
基本方案 1 制备含血清的培养基	6
基本方案 2 制备血清减量或无血清培养基	7
基本方案 3 HAT 选择培养基的制备	8
基本方案 4 转化细胞在软琼脂中的生长	9
支持方案 1 培养基中 pH 的调节	9
支持方案 2 抗生素在培养基中的应用	10
单元 1.3 细胞培养的无菌技术	11
基本方案 1 无菌技术	11
基本方案 2 层流式超净台的使用	12
单元 1.4 灭菌和过滤	13
基本方案 1 液体的高压灭菌	14
备择方案 干燥物品的高压消毒	15
基本方案 2 干热灭菌和清除热原法	16
基本方案 3 消毒剂的应用: 70% 乙醇	16
溶液的过滤除菌	17
基本方案 4 真空过滤	17
基本方案 5 小体积非水溶性液体的正压过滤	18
单元 1.5 确定和控制细胞培养的微生物污染	19
基本方案 1 细菌和真菌污染的检测	19
基本方案 2 直接培养法检测支原体污染	21
基本方案 3 应用抗生素控制微生物污染	23
单元 1.6 酵母培养及培养基	24

培养基的制备	24
酵母培养的综合考虑	30
第 2 章 细胞的制备与分离	35
单元 2.1 成纤维细胞培养的建立	36
基本方案	36
单元 2.2 人淋巴细胞的制备和培养	40
基本方案 1 通过高分子质量的蔗糖-泛影钠 (Ficoll-H ypaque) 梯度离心制备淋巴细胞 ..	40
基本方案 2 从淋巴细胞群里制备单核/巨噬细胞和树突状细胞	42
基本方案 3 通过包被在磁珠表面的单克隆抗体分选 T 细胞和 B 细胞	42
单元 2.3 人脐静脉内皮细胞的制备	44
基本方案	44
单元 2.4 转染 EB 病毒产生永生的 B 细胞株	45
基本方案	45
单元 2.5 激光捕获显微切割	46
基本方案 从组织切片中分离一种纯的细胞群	47
支持方案 苏木素和伊红染色组织的激光显微切割	49
第 3 章 亚细胞组分分离和细胞器分离	50
单元 3.1 细胞组分分离概述	51
单元 3.2 分离大鼠肝细胞质膜片层与浆膜结构域	59
基本方案 1 分离质膜片层	59
支持方案 1 检测碱性磷酸二酯酶 I 的活性	61
基本方案 2 分离质膜结构域	63
支持方案 2 K^+ 激活的对硝基苯酚磷酸酯酶活性测定实验	63
支持方案 3 $5'$ -核苷酸酶活性测定实验	64
支持方案 4 间接免疫荧光法检测与质膜片层相连的蛋白质	65
单元 3.3 利用差速及密度梯度离心法从组织和细胞中分离 Golgi 膜	66
基本方案 1 利用蔗糖密度筛从大鼠肝脏中快速分离 Golgi 膜	67
基本方案 2 将大鼠肝脏提取的轻线粒体组分悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离 Golgi 膜	68
基本方案 3 将培养的细胞悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离 Golgi 膜	69
基本方案 4 用自发形成梯度的 IODIXANOL 梯度液从肝细胞微粒体组分中分离 Golgi 膜	70
支持方案 测定 UDP-半乳糖半乳糖基转移酶	71
单元 3.4 利用差速离心及密度梯度离心从组织及细胞中分离溶酶体	72
基本方案 1 使用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液从大鼠肝脏中分离溶酶体	72
基本方案 2 利用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液从培养的人 HL-60 细胞中分离溶酶体	74
支持方案 1 酸性磷酸酶的测定	75
支持方案 2 β -N-乙酰葡萄糖胺酶的测定	76

单元 3.5 差速离心法从组织和细胞中分离线粒体	76
基本方案 1 用大鼠肝脏制备重线粒体组分	77
基本方案 2 牛心脏线粒体的大量制备	78
基本方案 3 用骨骼肌制备线粒体	79
基本方案 4 用培养的细胞制备线粒体	80
基本方案 5 用酵母菌(酿酒酵母)制备线粒体	80
单元 3.6 密度梯度离心法纯化粗线粒体组分	81
基本方案 1 用连续蔗糖梯度液分离大鼠肝脏的线粒体组分	82
基本方案 2 用非连续 PERCOLL 梯度液从大鼠脑分离线粒体	83
基本方案 3 用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液分离线粒体组分	84
支持方案 1 线粒体的琥珀酸脱氢酶分析	84
支持方案 2 溶酶体的 β -半乳糖苷酶分析	85
支持方案 3 过氧化物体的过氧化氢酶分析	86
单元 3.7 用差速离心法和密度梯度离心法从组织和细胞中分离过氧化物体 ..	86
基本方案 1 从大鼠肝脏分离轻线粒体组分	87
基本方案 2 用预先形成的连续 IODIXANOL 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的 过氧化物体	88
基本方案 3 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的 过氧化物体	89
基本方案 4 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液从酵母原生质体分离过氧化物体	90
基本方案 5 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液从培养细胞 (HepG2) 分离过氧 化物体	91
支持方案 内质网标志酶 NADPH 细胞色素 c 还原酶的分析	92
单元 3.8 从哺乳动物组织中分离细胞核及核膜	93
基本方案 1 使用蔗糖密度筛从大鼠肝组织匀浆中分离细胞核	93
备择方案 使用 IODIXANOL 梯度液从动物或植物(麦芽)细胞中分离细胞核	94
基本方案 2 分离细胞核膜: 高离子强度的方法	95
基本方案 3 分离细胞核膜: 低离子强度的方法	96
支持方案 1 二苯胺检测 DNA	97
支持方案 2 苔黑素测定 RNA	97
支持方案 3 溴化乙锭测定 RNA 及 DNA	98
单元 3.9 酿酒酵母的亚细胞组分分离	99
基本方案 1 利用差速离心法分离原生质体组分	111
支持方案 应用酶解酶制备酵母原生质体	113
基本方案 2 应用 NYCODENZ 进行平衡密度梯度组分分离	114
基本方案 3 在蔗糖分级梯度液中进行 P_{13000} 膜的组分分离	116
基本方案 4 应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的囊泡	118
基本方案 5 应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的细胞核	120

基本方案 6	应用 NYCODENZ 分级梯度液分离乳糖诱导的线粒体	124
基本方案 7	用蔗糖分级梯度液分离油酸盐诱导的过氧化物酶体	127
基本方案 8	用蔗糖分级梯度液分离内质网	129
基本方案 9	用蔗糖分级梯度液从完整的酵母细胞中分离质膜	131
基本方案 10	从完整的酵母细胞中分离细胞溶胶	132
第 4 章	细胞生物学的工具——抗体	135
单元 4.1	单克隆抗体的制备	136
基本方案 1	制备单克隆抗体的免疫方法	136
基本方案 2	细胞融合与杂交瘤细胞的选择	137
支持方案 1	筛选原始杂交瘤上清	140
支持方案 2	杂交瘤细胞系的建立	140
支持方案 3	用有限稀释法进行克隆化培养	141
支持方案 4	制备克隆化/扩增培养基	142
单元 4.2	多克隆抗体的制备	142
基本方案	用弗式佐剂免疫产生多克隆抗体	142
备择方案	用其他佐剂免疫产生多克隆抗血清	144
支持方案	血清的制备	145
单元 4.3	免疫球蛋白 G 的纯化	145
基本方案 1	硫酸铵沉淀和分子筛层析	145
基本方案 2	蛋白 A 葡聚糖亲和层析	146
备择方案 1	蛋白 G 葡聚糖亲和层析	148
备择方案 2	抗大鼠 κ 链单克隆抗体结合的葡聚糖亲和层析	148
基本方案 3	以 Tris·Cl 为缓冲液的 DE52 离子交换层析	149
单元 4.4	抗体缀合物用于细胞生物学研究	150
基本方案	抗体与荧光团或生物素的结合	150
支持方案	估计抗体浓度的方法	155
第 5 章	显微镜术	156
单元 5.1	光学显微镜的校准及调节	157
光学显微镜的主要部件		158
亮视场与荧光显微镜术成像及 Kohler 照明光路的基础知识		162
基本方案 1	亮视场, 透射显微镜术的 Kohler 照明校准	164
基本方案 2	目镜的校准	166
基本方案 3	表面荧光显微镜 Kohler 照明模式的校准	166
基本方案 4	相差显微镜术的校准	167
支持方案	显微镜光学部件的维护及清洗	169
单元 5.2	荧光显微镜术	170
荧光显微镜光学系统		170
荧光显微镜部件		171
数字化暗室		174

单元 5.3 免疫荧光染色	175
基本方案 培养细胞的免疫荧光标记	175
单元 5.4 荧光染料及荧光脂类衍生物标记细胞器	177
基本方案 1 固定细胞的内质网染色	179
备择方案 活细胞内内质网染色	180
基本方案 2 活细胞内高尔基复合体染色	180
基本方案 3 线粒体染色	182
单元 5.5 基本共聚焦显微镜术	183
光切基础	183
共聚焦显微镜的类型	184
应用指南	187
单元 5.6 用免疫过氧化物酶方法定位培养细胞和组织的抗原	191
计划策略	192
基本方案 1 培养细胞的免疫过氧化物酶染色	192
基本方案 2 组织的免疫过氧化物酶染色	194
单元 5.7 低温免疫金电子显微镜技术	196
基本方案 免疫金标记	197
支持方案 1 用免疫金标记方法固定细胞	198
支持方案 2 用免疫金标记方法固定组织	198
支持方案 3 免疫金标记方法做冰冻切片	199
支持方案 4 经碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格的准备	200
单元 5.8 相关的视频光学/电子显微镜术	201
基本方案 相关的视频光学/电子显微镜术	201
单元 5.9 活细胞内微管和肌动蛋白丝的荧光斑点显微镜技术 (FSM)	205
计划策略	205
基本方案 1 设计一个时延数字化 FSM 显微镜系统	206
基本方案 2 活细胞内细胞骨架的时延 FSM 成像	210
基本方案 3 时延 FSM 系列影像的定性和定量分析	212
支持方案 1 FSM 荧光标记的微管蛋白的制备	213
支持方案 2 FSM 荧光标记肌动蛋白的制备	216
单元 5.10 作为活细胞影像工具的 GFP	219
制备融合蛋白	219
第 6 章 细胞蛋白质的特性	225
单元 6.1 膜结合蛋白质的分析	226
基本方案 1 碱性碳酸盐提取	226
备择方案 1 尿素提取	227
备择方案 2 高盐提取	227
备择方案 3 Triton X-114 相位分离	227
支持方案 Triton X-114 预浓缩	228

基本方案 2	磷脂酰肌醇磷脂酶 (PI-PLC) 水解 GPI 结合蛋白	228
基本方案 3	Triton X-100 对不溶性整合膜蛋白和 GPI 结合蛋白的增溶作用	229
单元 6.2	蔗糖密度梯度区带沉淀法测定分子质量	230
基本方案 1	利用梯度自动形成仪制备蔗糖梯度的区带离心	231
备择方案 1	用简易梯度形成仪制备蔗糖梯度的区带离心	232
支持方案 1	普通分子质量标志物的应用和制备	234
基本方案 2	穿刺法分部收集样品	235
备择方案 2	管底穿刺蠕动洗脱分离法	236
支持方案 2	沉降系数的计算	236
单元 6.3	体积排阻层析法 (凝胶过滤) 测定分子质量	237
设计策略		238
基本方案 1	体积排阻-高效液相层析 (SE-HPLC)	239
基本方案 2	常规体积排阻层析 (SEC)	241
第 7 章	电泳与免疫印迹	244
单元 7.1	蛋白质的单向 SDS 凝胶电泳	246
基本方案	变性 (SDS) 不连续凝胶电泳; Laemmli 凝胶法	248
备择方案 1	Tris-tricine 缓冲液系统的电泳	252
备择方案 2	在梯度凝胶中分离蛋白质	254
单元 7.2	非变性条件下的单向凝胶电泳	256
基本方案	非变性聚丙烯酰胺连续电泳	256
备择方案	非变性不连续凝胶电泳以及分子质量标准曲线的绘制	260
单元 7.3	双向凝胶电泳	261
基本方案 1	高分辨率的平衡柱凝胶等电聚焦电泳	262
支持方案 1	pH 特性的测定	264
备择方案 1	极端酸性蛋白的非平衡等电聚焦电泳	265
备择方案 2	极端碱性蛋白的非平衡等电聚焦	265
支持方案 2	细胞抽提物的等电聚焦	266
基本方案 2	IEF 柱凝胶的第二向电泳	267
支持方案 3	标准分子质量蛋白质的双向凝胶	268
备择方案 3	对角线凝胶电泳 (非还原/还原凝胶)	269
单元 7.4	蛋白质单向平板凝胶等电聚焦电泳	270
基本方案	变性平板凝胶等电聚焦电泳	270
支持方案	变性等电聚焦平板凝胶的电转印	271
单元 7.5	蛋白质的琼脂糖凝胶	271
基本方案	琼脂糖凝胶电泳和印迹的免疫检测	271
单元 7.6	凝胶中蛋白质的染色	273
基本方案 1	考马斯亮蓝染色	273
备择方案	等电聚焦后进行考马斯亮蓝染色	274
基本方案 2	银染法	274

基本方案 3	蛋白质凝胶的荧光检测	276
基本方案 4	可逆蛋白锌染法	277
单元 7.7	免疫印迹和免疫检测	277
基本方案 1	用转移槽转印蛋白质	278
备择方案 1	用半干转移系统转印蛋白质	279
支持方案 1	转印后蛋白质的可逆染色	280
基本方案 2	用二抗偶联物进行免疫检测	281
备择方案 2	用亲和素-生物素偶联的二抗进行免疫检测	282
基本方案 3	用发色(光)底物显迹	282
支持方案 2	膜的清洗和再使用	283
单元 7.8	凝胶和印迹中放射性标记蛋白的检测和量化	283
基本方案	放射性自显影	283
支持方案 1	固定和干燥用于放射自显影的凝胶	285
支持方案 2	强化屏的使用	286
备择方案 1	荧光显影	286
支持方案 3	光密度计量	287
备择方案 2	磷光成像	287
第 8 章	蛋白标记和免疫沉淀	289
单元 8.1	用放射性标记的氨基酸进行代谢性标记	290
使用 ³⁵ S 标记的化合物的安全预防措施		291
基本方案	³⁵ S 甲硫氨酸脉冲标记悬浮细胞	291
备择方案 1	³⁵ S 甲硫氨酸脉冲标记贴壁细胞	292
备择方案 2	³⁵ S 甲硫氨酸脉冲-追踪标记细胞	293
备择方案 3	³⁵ S 甲硫氨酸长期标记细胞	293
备择方案 4	用其他放射性标记氨基酸进行的代谢性标记	294
支持方案	TCA 沉淀确定标记物的结合量	294
单元 8.2	用放射性标记的糖代谢性标记糖蛋白	295
基本方案	用放射性标记的糖进行脉冲-追踪标记	296
备择方案	用放射标记的糖进行的长期标记	297
单元 8.3	用放射标记的脂肪酸进行的代谢性标记	298
基本方案	用脂肪酸进行的生物合成标记	298
单元 8.4	细胞蛋白质的放射性碘化	299
使用 ¹²⁵ I 标记化合物的安全性预防措施		300
基本方案 1	应用乳糖过氧化物酶对细胞表面进行 ¹²⁵ I 标记	300
基本方案 2	去垢剂溶解的膜蛋白的碘化	301
支持方案	通过均质化进行膜的制备	302
基本方案 3	乳糖过氧化物酶催化的可溶性蛋白的碘化	302
单元 8.5	免疫沉淀	304
基本方案 1	应用非变性去垢剂裂解悬浮细胞的免疫沉淀	304

备择方案 1	非变性去垢剂溶液裂解贴壁细胞的免疫沉淀	307
备择方案 2	变性条件下去垢剂裂解细胞进行的免疫沉淀	308
备择方案 3	非去垢剂裂解的细胞免疫沉淀	308
基本方案 2	免疫沉淀-回收	308
单元 8.6	酵母蛋白的代谢标记和免疫沉淀	309
基本方案	酵母蛋白的标记和免疫沉淀	309
备择方案	制备酵母原生质体	311
第 9 章	蛋白质的磷酸化作用	313
单元 9.1	用 ³² P 标记培养细胞和制备用于免疫沉淀的细胞裂解物	314
基本方案	用 ³² P 标记的培养细胞和使用温和的去垢剂裂解细胞	314
备择方案	在 SDS 中煮沸裂解细胞	315
单元 9.2	磷酸化的免疫检测	316
基本方案 1	应用免疫印迹技术对蛋白质磷酸化的免疫测定	316
基本方案 2	由免疫印迹产生的免疫沉淀物来免疫监测蛋白质的磷酸化作用	319
基本方案 3	组织培养细胞的荧光免疫染色	320
单元 9.3	MAP 蛋白激酶信号的检测	321
基本方案 1	通过免疫沉淀反应测定 MAP 激酶 (ERK) 的活性	322
基本方案 2	凝胶内激酶测定	324
基本方案 3	JNK 测试	325
支持方案	GST-JUN-谷胱甘肽珠子的准备	326
第 10 章	蛋白质转运	328
单元 10.1	用糖苷酶研究蛋白质转运	329
基本方案 1	内切糖苷酶 H 消化	329
基本方案 2	肽: N-糖苷酶 F 消化	330
基本方案 3	唾液酸酶 (神经氨酸苷酶) 消化	331
基本方案 4	α 内切-N-乙酰氨基半乳糖苷酶	332
单元 10.2	内吞作用	333
基本方案 1	测量转铁蛋白受体在表面和内部间的稳态分布	333
基本方案 2	测量转铁蛋白内化作用动力学	334
备择方案 1	采用 ¹²⁵ I 标记抗体测量膜蛋白内化作用动力学	335
备择方案 2	测量悬浮生长细胞的转铁蛋白内化作用动力学	336
基本方案 3	测量转铁蛋白受体再循环的动力学	337
支持方案 1	带金属离子的转铁蛋白	338
支持方案 2	二铁转铁蛋白的放射性标记	338
基本方案 4	测量液相摄取	339
支持方案 3	通过撤除钾离子来抑制网格蛋白介导的内吞作用	340
支持方案 4	通过胞质酸化来抑制网格蛋白介导的内吞作用	340
单元 10.3	蛋白质转运到质膜	341
基本方案	采用唾液酸酶消化测定到达细胞表面	341

备择方案	通过细胞表面分子的生物素化来测量到达细胞表面	342
单元 10.4	极化上皮细胞中的膜转运	343
基本方案 1	转染极化上皮细胞悬液和选择抗性克隆	344
支持方案 1	挑取稳定转染的克隆	345
支持方案 2	在过滤器上培养上皮细胞	345
支持方案 3	测量生长在过滤器上的单层细胞的泄漏	347
基本方案 2	极化上皮细胞中的脉冲-追踪实验	347
基本方案 3	新合成上皮细胞表面蛋白的生物素化	348
基本方案 4	极化上皮细胞蛋白的间接免疫荧光分析	349
第 11 章	细胞增殖, 细胞衰老和细胞死亡	351
单元 11.1	用流式细胞术确定细胞周期阶段	352
基本方案 1	用碘化丙啶染色的固定化细胞的细胞周期分析	353
备择方案 1	用 DAPI 染色的固定细胞的细胞周期分析	355
基本方案 2	用 PI 染色的非固定、去垢剂渗透细胞的细胞周期分析	355
备择方案 2	用 DAPI 染色的非固定、去垢剂渗透细胞的细胞周期分析	356
基本方案 3	活细胞用 Hoechst 33342 进行染色	356
基本方案 4	DNA 含量和 Cyclins D、E、A 或 B1 的二元分析	356
单元 11.2	在细胞周期的特定时期细胞同步化的方法	358
基本方案 1	采用有丝分裂震脱富集有丝分裂细胞	358
备择方案 1	预富集指数生长培养物用于分离有丝分裂细胞	359
备择方案 2	通过诺考达唑阻滞富集有丝分裂细胞	359
基本方案 2	通过血清饥饿富集 G ₀ /G ₁ 细胞	359
备择方案 3	通过氨基酸饥饿富集 G ₀ /G ₁ 细胞	360
基本方案 3	用洛伐他汀富集 G ₁ 期细胞	360
备择方案 4	用含羞草碱阻滞富集 G ₁ 期细胞	361
基本方案 4	通过双重胸苷阻滞使细胞在 S 期起始处达到同步化	361
备择方案 5	进行连续的 G ₁ /S 阻滞	362
支持方案 1	测定有丝分裂指数	363
支持方案 2	通过 TCA 沉淀监测 ³ H 胸苷掺入 DNA	364
单元 11.3	分析细胞周期中 CDK 活性和 DNA 复制	365
基本方案 1	测量 CDK 活性	365
基本方案 2	用 BrdU 掺入测量 DNA 复制	368
单元 11.4	通过 DNA 片段化和形态学标准评价凋亡和坏死	370
基本方案 1	台盼蓝排斥测量细胞死亡	371
基本方案 2	细胞的差异染色	371
基本方案 3	细胞的 Hoechst 染色	372
支持方案	Cytospin 制备用于分析的细胞	373
基本方案 4	细胞 DNA 片段化的 TUNEL 分析	373
备择方案 1	石蜡包埋切片的 TUNEL 分析	374

基本方案 5	整个细胞 DNA 片段化的检测	375
备择方案 2	总基因组 DNA 的 DNA 片段化检测	376
备择方案 3	检测 DNA 片段化的简单方案	377
备择方案 4	用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 片段的酚抽提	378
基本方案 6	DNA 片段的定量分析	379
基本方案 7	用脉冲场琼脂糖凝胶电泳检测高分子质量染色质片段	380
单元 11.5	细胞凋亡期间 Caspase 活化分析	382
基本方案 1	Caspase 活性的酶促分析	382
基本方案 2	用免疫印迹检测 Caspase 活性	384
备择方案 1	盐酸胍裂解细胞用于免疫印迹	385
支持方案 1	从印迹上去除 (剥离) 第一抗体和第二抗体	386
基本方案 3	用生物素化底物类似物标记和检测活化的 Caspases	386
备择方案 2	用亲和标记测量天然裂解液中的 Caspase 体外活化	387
支持方案 2	亲和标记活化 Caspase 特异性控制	388
支持方案 3	d-生物素存在时将膜剥离用于抗体再次杂交	388
第 12 章	体外重建	390
单元 12.1	体外翻译	392
基本方案 1	制备和使用依赖 mRNA 的兔网织红细胞无细胞翻译体系	392
基本方案 2	依赖 mRNA 的麦胚无细胞翻译体系的制备和使用	394
基本方案 3	利用协同转录/翻译体系进行体外蛋白质合成	396
支持方案 1	无帽体外转录物的制备	397
支持方案 2	带帽体外转录物的制备	398
备择方案	用生物素连接的氨基酸进行体外翻译	399
支持方案 3	用链霉亲和素-琼脂糖捕获生物素连接的蛋白质	400
单元 12.2	蛋白质共翻译转运进入犬粗面微粒体	401
基本方案	向犬粗面微粒体的转运	401
支持方案 1	从犬胰腺制备 RM	402
支持方案 2	制备 EDTA 剥离的粗面微粒体	404
支持方案 3	柱洗脱粗面微粒体的制备	404
单元 12.3	体外分析哺乳动物细胞中内质网到高尔基体的物质运输	405
基本方案 1	用半完整细胞重建内质网到高尔基体的运输	405
备择方案	用半完整细胞重建内质网到高尔基体顺面区域的运输	408
基本方案 2	用哺乳动物细胞微粒体体外重建内质网到高尔基体的运输	408
基本方案 3	内质网膜泡的体外形成和分离	409
支持方案 1	NRK 细胞微粒体膜的制备	411
支持方案 2	VSV ts045 病毒的繁殖	412
基本方案 4	内质网囊泡与高尔基体膜的融合	412
支持方案 3	制备大鼠肝细胞细胞液	414
支持方案 4	从大鼠肝细胞制备高尔基体膜	414

单元 12.4	用洋地黄皂苷透化细胞进行核物质输入	416
基本方案	贴壁型 HeLa 细胞中的核物质输入	416
支持方案 1	制备非洲爪蟾卵细胞细胞液	417
支持方案 2	制备荧光标记的核输入性底物 TRITC-BSA-NLS	419
支持方案 3	制备荧光标记的重组核输入性底物 GFP-GST-NLS	420
单元 12.5	非洲爪蟾间期卵提取物的制备和使用	422
基本方案 1	制备分裂间期卵提取物	422
备择方案 1	制备间期细胞的分级分离提取物	424
支持方案 1	用注射方法获得非洲爪蟾卵细胞	424
基本方案 2	用分裂间期卵细胞提取物进行核组装	425
支持方案 2	制备去膜精子染色质作为核组装模板	426
基本方案 3	体外进行核蛋白输入	429
基本方案 4	用连续标记 DNA 方法分析复制过程	430
备择方案 2	用脉冲标记 DNA 方法分析复制过程	431
基本方案 5	制备卵母细胞提取物	431
支持方案 3	免疫去除方法去除提取物蛋白质	433
支持方案 4	向提取物中加入目的蛋白	434
单元 12.6	利用非洲爪蟾卵细胞提取物分析细胞周期	434
基本方案 1	制备细胞周期提取物	434
基本方案 2	制备被 CSF 抑制的提取物	436
基本方案 3	制备有丝分裂提取物	438
基本方案 4	使间期提取物进入有丝分裂	438
备择方案	在体外生成复制检验点	439
支持方案 1	监测提取物的细胞周期状态	440
支持方案 2	检测组蛋白 H1 激酶活性	440
支持方案 3	使被 CSF 抑制的提取物进入间期	441
单元 12.7	有丝分裂纺锤体的体外组装	442
基本方案 1	分析 DMSO 和中心体的星体反应	442
基本方案 2	分析精子 DNA “半纺锤体” 反应	443
基本方案 3	分析精子 DNA 周期性反应	444
基本方案 4	分析 DNA 磁珠反应	445
支持方案 1	制备 CSF 提取物	446
支持方案 2	制备罗丹明标记微管蛋白	447
支持方案 3	马达蛋白的破坏	448
支持方案 4	甩片反应	449
支持方案 5	制备 DNA 包被磁珠	451
单元 12.8	利用非洲爪蟾卵提取物研究细胞凋亡	452
基本方案	制备凋亡提取物并检测凋亡过程	452
备择方案	将凋亡分成潜伏时相和执行时相	453

支持方案 1	检测 Caspase3 样活性	454
支持方案 2	利用爪蟾卵提取物制备线粒体	454
支持方案 3	检测细胞色素 c 的释放	455
支持方案 4	用纯化的线粒体和细胞质检测细胞色素 c 的释放	455
单元 12.9	体外转录	456
基本方案	利用核提取物进行体外转录反应	456
支持方案 1	用 HeLa 细胞制备核提取物	457
支持方案 2	制备高盐果蝇核提取物	459
支持方案 3	从分离出的果蝇胚胎核制备可溶性核组分	462
支持方案 4	体外转录产物的引物延伸分析	462
第 13 章	细胞黏附与细胞外基质	465
单元 13.1	细胞-底物黏附试验	467
基本方案 1	伸展试验	468
基本方案 2	附着试验	469
支持方案	制备肽-蛋白结合物	471
单元 13.2	利用离心力定量测定细胞黏附能力	471
基本方案	离心细胞黏附试验	472
单元 13.3	依赖钙黏素的细胞-细胞黏附	474
研究策略		474
基本方案 1	短期聚集培养	474
备择方案	长期聚集培养	476
基本方案 2	混合细胞聚集培养	477
支持方案 1	以 TC 处理成纤维细胞使细胞解离	478
支持方案 2	以 TC 处理胚胎细胞使细胞解离	478
支持方案 3	以 LTE 或 TE 处理细胞使细胞解离	479
基本方案 3	检测钙黏素和连环蛋白	480
基本方案 4	抑制钙黏素的功能	481
基本方案 5	在钙黏素缺乏或连环蛋白缺陷的细胞系中, 恢复钙黏素的活性	482
单元 13.4	分析整合素依赖性黏附	482
基本方案 1	在基于细胞的试验中分析整合素依赖性黏附	482
基本方案 2	固相分析整合素-配体相互作用	484
支持方案 1	整合素的纯化	486
支持方案 2	抗体与 Sepharose 的交联	488
支持方案 3	用生物素标记整合素配体	490
单元 13.5	分析由免疫球蛋白超家族细胞黏附分子所介导的细胞-细胞联系	490
基本方案 1	通过免疫亲和层析技术纯化 IgSF-CAM	490
支持方案 1	制备亲和层析柱	491
支持方案 2	溶解膜蛋白	492
基本方案 2	利用荧光微球分析蛋白质的相互作用	493

支持方案 3	将蛋白质与荧光微球相交联	494
基本方案 3	蛋白微球与培养细胞的结合	495
基本方案 4	用骨髓瘤细胞作交互作用试验	496
支持方案 4	用原生质体融合方法对骨髓瘤细胞进行稳定转染	497
基本方案 5	神经突外长试验	500
基本方案 6	在体外抑制 CAM-CAM 相互作用	500
支持方案 5	用 IgSF-CAM 包被细胞培养皿	501
支持方案 6	硝酸纤维素预先包被玻璃表面	502
单元 13.6	纤连蛋白的纯化	502
基本方案 1	纯化血浆纤连蛋白	502
基本方案 2	从培养细胞中纯化纤连蛋白	504
备择方案 1	亲和纯化提取的细胞纤连蛋白	505
备择方案 2	从条件培养基中纯化人细胞纤连蛋白	505
单元 13.7	玻连蛋白的纯化	507
基本方案	507
单元 13.8	制备胶冻状的基质	509
基本方案 1	制备 I 型胶原基质	509
基本方案 2	制备 M atrigel 基质	510
备择方案 1	在 M atrigel 基质中培养细胞	510
备择方案 2	在体内使用 M atrigel 基质做血管发生检验和肿瘤生长试验	511
单元 13.9	制备培养的角膜内皮细胞和 PF-H R9 内胚层细胞分泌的细胞外 基质	512
基本方案	制备牛角膜内皮细胞胞外基质 (BCE-ECM)	512
备择方案	制备 HR9-ECM	514
支持方案 1	细胞增殖检验	515
支持方案 2	细胞分化检验	515
单元 13.10	制备培养的成纤维细胞产生的细胞外基质	516
基本方案	制备培养的成纤维细胞产生的细胞外基质	516
支持方案 1	细胞附着检测	517
支持方案 2	确定细胞的形状	518
支持方案 3	成纤维细胞来源的三维基质的机械压缩	520
支持方案 4	成纤维细胞来源的三维结构基质的溶解	521
单元 13.11	蛋白聚糖的分离和分析	522
基本方案 1	从培养细胞分离蛋白聚糖	522
备择方案	分离蛋白聚糖库	523
支持方案	³⁵ S O ₄ 或 ³ H 葡萄糖胺标记蛋白聚糖	523
基本方案 2	二乙氨基乙基-葡聚糖纤维素进行蛋白聚糖的阴离子交换层析纯化	524
基本方案 3	按大小排阻的层析法分析蛋白聚糖	524
基本方案 4	碱性消除法分析葡聚糖胺的大小	525

基本方案 5	用木瓜蛋白酶消化法分析葡聚糖胺的分子质量	526
基本方案 6	用裂解酶降解葡聚糖胺, 分析葡聚糖胺的含量和蛋白核心	526
基本方案 7	用硝酸处理法降解硫酸乙酰肝素	527
基本方案 8	分析葡聚糖胺的类型和核心蛋白	527
基本方案 9	分析葡聚糖胺的大小	528
基本方案 10	蛋白聚糖的免疫沉淀	528
单元 13.12	基质金属蛋白酶	529
基本方案 1	活细胞的胶原纤维的溶解和降解	529
支持方案	制备大鼠尾腱 I 型胶原	530
基本方案 2	白明胶/干酪素酶水解图谱分析	532
基本方案 3	反向酶水解图谱分析	533
第 14 章	细胞的能动性	535
单元 14.1	真核细胞趋化实验	535
策略设计		535
基本方案 1	滤膜趋化实验	536
支持方案 1	计算无化学吸引剂时细胞迁入厚滤膜的大约距离	538
基本方案 2	琼脂糖下趋化实验	539
基本方案 3	少量细胞趋化实验	540
基本方案 4	桥趋化实验	541
基本方案 5	吸管趋化实验	542
单元 14.2	侵袭实验	543
基本方案	测量经基质的侵袭	543
支持方案	准备涂布 Matrigel 的滤膜	544
单元 14.3	细胞牵引力	545
基本方案 1	检测细胞在起皱底物上的牵引力	545
支持方案 1	校准微型针	546
备择方案 1	用另一种聚合物检测细胞在起皱底物上的牵引力	547
备择方案 2	检测细胞在无皱褶底物上的牵引力	547
支持方案 2	制备改装的喷枪	548
基本方案 2	测量在微机械制造的底物上的细胞牵引力	549
支持方案 3	硅烷化盖玻片	552
支持方案 4	制备偏光反射立方体	552
单元 14.4	细胞损伤实验	553
策略设计		553
基本方案	用荧光素右旋糖酐检测培养单层细胞的损伤	554
备择方案 1	用荧光素右旋糖酐检测哺乳动物组织的损伤	555
备择方案 2	以白蛋白作为损伤示踪剂检测细胞损伤	557
单元 14.5	盘基网柄菌属细胞动力学	558
基本方案 1	观察单个活细胞内 GFP 标记的蛋白质	558

备择方案 1	普遍加入化学吸引剂后的 GFP 标记蛋白的图像记录	559
备择方案 2	化学吸引剂梯度作用下的 GFP 标记蛋白的图像记录	560
基本方案 2	聚集细胞群和损伤细胞的 GFP 标记蛋白的图像记录	561
支持方案 1	质粒构建和转化	561
支持方案 2	细胞在无营养琼脂上发育的表型筛选	563
第 15 章	细胞器运动	564
单元 15.1	微管/细胞器运动实验	564
基本方案	微管/细胞器运动实验	564
支持方案 1	简单灌流室和盖玻片的制备	567
支持方案 2	海胆精子轴丝的制备	568
支持方案 3	猪脑微管蛋白的制备	569
支持方案 4	大鼠肝细胞溶胶的制备	573
支持方案 5	大鼠肝细胞器组分的制备	573
单元 15.2	肌动蛋白通过肌球蛋白移动的体外运动实验	575
基本方案	分析肌动蛋白通过肌球蛋白的移动	575
支持方案 1	灌流室的制备	577
支持方案 2	肌动蛋白的纯化	578
支持方案 3	罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白的制备	579
单元 15.3	植物细胞的细胞器运动：通过绿色荧光蛋白 (GFP) 使高尔基复合体和内质网的运动成像	580
基本方案	瞬时表达在树叶内质网和高尔基探针可视化方面的应用	580
单元 15.4	细胞核运动	582
基本方案	细胞核运动实验	582
支持方案 1	从淋巴细胞分离中心体	585
支持方案 2	浓缩中心体的滴定	587
支持方案 3	制备用于细胞核组装的分裂间期提取物	588
支持方案 4	高速上清液 (HSS) 的制备	591
支持方案 5	以 DNA 包被磁珠作为模板组装细胞核	591
附录		593
附录 1	试剂与溶液	593
附录 2	实用信息和数据	709
2A	实用测量值和数据	709
2B	细胞生物学研究中常用的药物概要	710
2C	放射性同位素的数据	734
2D	常见荧光的最大吸收和激发波长	738
2E	离心机及转子	743
附录 3	常用技术	750
3A	分光光度计测量蛋白质浓度	750
3B	比色法检测和定量总蛋白	753

3C	蛋白质溶液的透析和浓缩	766
3D	用吸收和荧光光谱学定量 DNA 和 RNA	769
3E	DNA 的 PCR 酶促扩增：标准程序和优化	772
3F	微量 RT-PCR	778
附录 4	试剂和仪器设备供应商选录	781
参考文献	827
索引	835

第 1 章 细胞培养

细胞生物学起源于 17 世纪下半叶由 Robert Hooke 提出的“细胞”概念。然而，直到 20 世纪中叶，细胞培养技术才逐渐发展起来。事实上，1998 年定为第一个连续哺乳动物细胞系的五十周年。如今，细胞培养已成为细胞生物学一个密不可分的组成部分，人们已很难想像“培养前”时期的该领域的状况。由于细胞的维持和增殖已成为生物化学、生物物理学、遗传学、免疫学、生理学、分子生物学和神经科学的重要内容，因此，细胞培养也是细胞生物学延伸至相关学科的一条主要途径。所以，我们在《精编细胞生物学实验指南》第 1 章中介绍一些有关细胞培养的方法是十分恰当的。

细胞培养的直接目的是维持或扩增细胞数量，其最重要的考虑则是细胞活力。在标准化培养和实验条件下，细胞数目及活力测定极其重要。由于培养中活细胞增殖，这样可通过细胞传代达到细胞扩增以满足实验需要。为避免污染、恒温培养箱故障或实验者出现差错而造成细胞系丢失，细胞的冻存、储备、复苏提供了必要的安全保障。除细胞保种外，冻存细胞还可避免细胞衰老及遗传漂变。所以，第 1 章首先介绍细胞传代、细胞冻融和细胞数目及活力测定（单元 1.1）。

细胞培养成功与否主要取决于培养基的选择。它至少要为细胞提供生长所必需的营养物质，以及各种所需的生长因子、稳定的 pH 和存活要求的渗透压。种类繁多的培养基的发展史对实验用的细胞类型影响显著，这缘于特定环境中增殖的细胞系始终被选择出来，而那些不能在此环境中生长的细胞被淘汰。因此，单元 1.2 集中介绍培养基的使用和标准、无血清培养基和选择性培养基，以及适于锚定非依赖性生长软琼脂的使用方法。

本章其他三个单元将介绍细胞培养的微生物污染问题。单元 1.3 讲解基本无菌技术和层流式超净台，那是防止污染的重要手段。单元 1.4 介绍过滤和加热消毒（如高压灭菌），以及消毒剂的使用。单元 1.5 介绍微生物（细菌、真菌和支原体）污染的检测。虽然解决这些污染问题最好的办法也许要先搞清前一单元中高压灭菌并忠实地遵循其规程，但是被污染细胞系的抢救性培养仍然是理所当然的，因此，以此为目的的单元 1.5 详细讨论了抗生素的应用。

当然，尚有一部分细胞生物学家并不认为哺乳动物细胞培养中出现真菌污染是件令人头痛的事情，相反的，把它当作一个有趣目标的科学家们则希望酵母菌增殖。单元 1.6 提供了如何进行酵母细胞培养基的配制和基本的培养方法学。

有关哺乳动物细胞培养的详尽资料，读者可直接查阅 Freshney (1993a) 的文献。

参考文献：Freshney, 1993a

撰稿人：Joe B. Harford

单元 1.1 哺乳动物细胞培养的基本方法

原代细胞培养分为四个不同的生长期。第一期，细胞要适应体外环境；第二期，细胞经历一个指数生长期，约持续 30 代；第三期，细胞生长速度缓慢，形成一个渐进的较长的生长时期；最后，经 40~50 代之后，细胞开始衰老、死亡。有时人们希望通过细胞培养对某一特殊细胞系进行数月或数年的研究，因此培养物应被维持以保留细胞系的完整性。可将早期传代的细胞悬液等分进行冷冻，然后根据需要解冻再培养。冷冻培养可预防由遗传漂变引发的改变，还可避免由衰老或意外污染导致的细胞丢失。

多数情况下，细胞或组织必须经数日或数周培养获得足够数量才能进行分析，长期培养的维持要求严格遵守无菌条件，以避免污染和珍贵细胞系的丢失（单元 1.3）。

影响细胞生长的另一个重要因素是组织培养基的选择。现在已有多种不同配方的培养基可供利用，每个实验室必须确定哪种培养基最适合自己的要求。个别实验室还可以选择使用商品化的培养基或自己制备。前者一般无菌，即时可用。它们或为液体，或是呈粉末状，除能提供细胞生长所需营养物质外，还含有抑制微生物生长的抗生素、制霉菌素或两者兼有。培养基的制备详见单元 1.2。

当细胞生长至汇合后，必须对它们进行分离培养或传代。如果不对汇合的细胞进行传代，将导致细胞分裂指数降低，最终导致细胞死亡。单层贴壁细胞传代的第一步就是采用胰蛋白酶消化或机械法使细胞从原代培养的瓶壁上分离下来，此细胞悬液以 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/ml 的浓度重新接种至新的培养瓶中。次级培养需检测生长情况，定期换液，随后可能还要再次传代而形成三级培养等。传代时间视细胞生长速率和细胞系的不同而定。

警告：当使用人血、细胞或感染性因子时，必须遵守适当的生物安全规则。

注意：所有要与活细胞接触的液体和器皿都必须灭菌，并采用相应的无菌技术。

注意：除其他特殊情况外，所有细胞培养应在 37°C ，5% CO_2 的恒温培养箱中进行。一些培养液（如 DM EM）可根据需要改变 CO_2 浓度，以保证 pH 维持在 7.4。

基本方案 单层细胞的胰酶消化和传代

材料（带√项见附录 1）

细胞的原代培养

√无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 HBSS， 37°C

√胰蛋白酶/EDTA 溶液， 37°C

含有血清的完全培养基，如含 10%~15% (v/v) FBS 的 DM EM（完全的 DM EM-10 或 DM EM-15）， 37°C

无菌的巴氏移液管

37°C 温盘或温箱

细胞培养用塑料或玻璃器皿，包括移液管、 25cm^2 培养瓶、60mm 培养皿，无菌

1. 用无菌的巴氏移液管吸尽原培养皿中的旧培养液，以少量 37°C ，无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 HBSS 洗单层贴壁细胞 1 或 2 次，以洗去抑制胰蛋白酶活性的胎牛血清。
2. 加足量的 37°C 胰蛋白酶/EDTA 溶液，以覆盖住贴壁的细胞。
3. 培养皿置 37°C 温盘上 1~2 min，轻轻叩击平皿底部使细胞游离。于倒置显微镜下观察细胞变圆，并从附着面脱离。
4. 加 2 ml 37°C 的完全培养液，用移液管吸取细胞悬液吹打平皿底部 2 或 3 次，使底表面上残留的细胞脱落下来。一旦细胞呈单个分散状态，立即加入血清或含血清的培养液，进一步抑制胰酶的消化活性，因为它会对细胞产生损害作用。
5. 在每一个做了标记的新平皿或瓶中加入等体积的细胞悬液。或者用血细胞计数板计数细胞，调节细胞浓度约为 5×10^4 个/ml，然后将一定量的细胞接种到每一个培养皿或瓶中。
6. 每一瓶中补充 4 ml 培养液，然后置于 37°C ，5% CO_2 加湿培养箱中孵育。
7. 如有必要，3 或 4 天后，去除旧培养液，添加 37°C 的新培养液至亚汇合的培养物中。
8. 当细胞汇合后，重复 1~7 步骤，进行传代。

备择方案 悬浮培养的细胞传代

1. 每 2~3 天后细胞生长密集，轻轻地将悬液培养的细胞从孵育箱中取出而不要摇动它，此时细胞沉降在瓶的底部。去掉 1/3 的旧液，加入等量的预热培养液。如果培养液体积小于 15 ml，轻轻摇动培养瓶使细胞悬浮，然后水平放入培养箱。
2. 在不需要更换培养液的培养期内，只需摇动培养瓶使细胞悬浮，观察培养液颜色的变化，它直接显示细胞生长代谢状况。
3. 当细胞生长到 2.5×10^6 个/ml 时进行传代。从培养箱中取出培养瓶，摇动以重悬细胞。将一半的细胞悬液移入一个新培养瓶中，每瓶再补加预热的培养液 7~10 ml，然后放入培养箱。

支持方案 1 人单层贴壁细胞的冻存

为了保存细胞，避免衰老，降低污染的风险，最大限度地减少遗传漂变，应用加入冷冻保护剂的方法可长期储存细胞系。

材料

平皿中处于对数生长期的单层细胞

完全培养基（如有补充物的 DMEM，见 DMEM 配方）

细胞冻存液，含 10%~20% (v/v) 胎牛血清、5%~10% DMSO (v/v) 的完全培养液， 4°C

台式临床用离心机，配有 45° 固定角度或水平式转头（如 Fisher Centrifric 或 Clay Adams Dynac）