



博学厚德
尚美健行

沈阳师范大学
SHENYANG NORMAL UNIVERSITY

课程教案



课程名称: 细胞生物学实验

学习主体: 生物科学本科生

授课时间: 第四学期

主讲教师: 王 泽

采用教材: 《细胞生物学实验》 王金发主编

2024 年 1 月 修订

目 录

课程概述	1
实验一 普通光学显微镜的调试与观察	4
实验二 暗视野显微镜的制作与使用	20
实验三 细胞膜的渗透性及意义	24
实验四 液泡系及线粒体的活体染色与观察.....	32
实验五 植物细胞骨架的光学显微镜观察	38
实验六 植物原生质体的分离与诱导融合	43
实验七 动物细胞培养的无菌化准备	49
实验八 动物细胞传代培养的虚拟仿真实训.....	59
实验九 动物贴壁细胞的复苏.....	64
实验十 动物贴壁细胞的传代培养	68
实验十一 动物贴壁细胞的冻存	73

课程概述

课程基本情况	课程名称	细胞生物学实验	课程代码	02301670
	授课对象	生物专业（师范）	课程性质	专业选修
	学时	48	学分	1.5
	考核方式	考查（课堂表现测评、网络平台综合测评、期末测评）		
教材及参考资料	推荐教材： 《细胞生物学实验教程》(第二版)，王金发等，科学出版社，2011.			
	参考书目： 《生物技术综合实验》，马纯艳等，辽宁科学技术出版社，2016. 《细胞生物学实验》(第二版)，杨汉民，高教出版社，1995. 《细胞实验指南》(上、下)，D.L.斯佩克特，科学出版社，2003. 多媒体资源： 生命科学学院动物细胞培养虚拟教学平台； 沈阳师范大学超星智慧教学平台： http://synudx.fanya.chaoxing.com/portal ； 沈阳师范大学网络教学平台： http://210.30.208.205 ；			
课程目标	<p>基于混合式学习平台，综合强化学生操作实训，提升师范生实验教学技能。基于实验原理分析，创设自主反思的问题情境，多元化培养学生科学素养。</p> <p>课程目标 1：学生在分析解读细胞生物学实验原理之上，规范开展显微镜使用、植物细胞骨架标本制作、植物原生质体分离及诱导融合、细胞器超活染色、显微摄影等实验操作；具有独立完成细胞生物学基础实验操作的能力，能够支撑基础教育中相关实验教学的需要。</p> <p>课程目标 2：学生掌握细胞生物学相关的基本设计理念，如实验数据处理、“双盲实验”等，了解生物显微镜、细胞融合技术、动物细胞培养及显微摄影等技术在社会实践和科学研究领域中的应用价值。</p> <p>课程目标 3：学生通过不同类型实验的训练，逐渐形成信息收集整理、创新、反思等科学素养，在生物科学研究和实践中，形成主动分析和解决问题的意识和能力。</p>			

教学内容学时分配			
章次	内容	实验类型	学时
实验一	普通光学显微镜的调试与观察	验证型实验	4
实验二	暗视野显微镜的制作与观察	验证型实验	4
实验三	细胞膜的渗透性及意义	设计型实验	4
实验四	液泡系及线粒体的活体染色与观察	设计型实验	4
实验五	植物细胞骨架的光学显微镜观察	验证型实验	4
实验六	植物原生质体的分离与诱导融合	综合型实验	4
实验七	动物细胞培养的无菌化准备	验证型实验	8
实验八	动物细胞传代培养的虚拟仿真实训	综合型实验	4
实验九	动物贴壁细胞的复苏	综合型实验	4
实验十	动物贴壁细胞的传代培养	综合型实验	4
实验十一	动物贴壁细胞的冻存	综合型实验	4
混合式 教学设计	<p>教师统筹安排</p> <p>线上部分</p> <ul style="list-style-type: none"> 课程内容 导学作业 ①基于“作业状态数据”掌握学生的知识盲区 ②设置讨论内容 <p>线下部分</p> <ul style="list-style-type: none"> ①梳理难点 ②引导探究 ③生成性教学 <p>学生开放性学习</p> <ul style="list-style-type: none"> ①课件内容 ②视频资料 ①10道层级递进的、高阶性探究问题 ②学生对实验原理、结果等进行探究学习 ①深入讨论、探究 ②形成课堂探究的内在动力 学生自主生成 ①个性化实验方案 ②组内协作探究 <p>学习目标即评价指向</p> <ul style="list-style-type: none"> 信息收集整理 思维训练 主动探究 协作交流 深化 主动探究 协作交流 实践技能 <p>基于学生的状态数据，进行过程性评价</p> <p>基于学生的学习反馈，过程性评价教学内容</p>		

备注	<p>1. 根据每年培养方案及授课学时的要求，制定实验教学内容，其中：</p> <p>2018 级（32 学时）：实验一至实验六，实验十一</p> <p>2019 级（24 学时）：实验一至实验六</p> <p>2020 级（48 学时）：实验一至实验九</p> <p>2021 级（48 学时）：实验一至实验九</p> <p>2022 级（48 学时）：实验一至实验十一</p> <p>2. 基于“混合式”课题教学改革，考核方式的调整如下：</p> <p>2018 级：</p> <p>30%实验综合能力 + 30%报告册+ 40%期末测试</p> <p>2019 级：</p> <p>（1）总评成绩=50%课堂表现测评+20%网络平台作业测评+30%期末测评</p> <p>（2）课堂表现测评=10%出勤情况+10%课堂回答问题情况+60%实验操作情况+20%报告册书写情况</p> <p>（3）网络平台作业测评=50%作业+15%课程音视频学习+15%学习次数+20%讨论</p> <p>2020 级：</p> <p>（1）总评成绩=50%课堂表现测评+20%网络平台作业测评+20%期末测评</p> <p>（2）课堂表现测评=10%出勤情况+10%课堂回答问题情况+60%实验操作情况+20%报告册书写情况</p> <p>（3）网络平台作业测评=50%作业+15%课程音视频学习+15%学习次数+20%讨论</p> <p>2021 级：</p> <p>（1）总评成绩=50%课堂表现测评+20%网络平台作业测评+30%期末测评</p> <p>（2）课堂表现测评=10%出勤情况+10%课堂回答问题情况+60%实验操作情况+20%报告册书写情况</p> <p>（3）网络平台作业测评=50%作业+15%课程音视频学习+15%学习次数+20%讨论</p> <p>2022 级：</p> <p>（1）总评成绩=50%课堂表现测评+20%期末测评+10%课程音频学习+10%线上作业+10%课程积分</p> <p>（2）课堂表现测评=10%出勤+10%课堂互动+60%实验操作+20%报告册书写</p>
----	---

实验一 普通光学显微镜的调试与观察

实验目的	(1) 掌握普通光学显微镜的标准操作； (2) 学会光学显微镜光路合轴的调试； (3) 通过人口腔上皮细胞形态的规范观察，进行标准的生物绘图；
学习重点	(1) 知晓光学显微镜每个结构的功能和标准使用方法； (2) 掌握光路合轴标准的调节方法；
学习难点	(1) 标准化操作光学显微镜的光路合轴；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究、文献调研、团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[普通光学显微镜及暗视野显微镜的使用] --> B[光学显微镜] A --> C[暗视野显微镜] B --> D[结构和功能] B --> E[光路合轴原理和标准化操作] B --> F[标准化操作] C --> G[成像原理] C --> H[成像特点] C --> I[制作暗视野成像效果] F --> J[人口腔上皮细胞标本制作与观察] I --> K[浮游生物（剑水蚤）的观察] </pre>

授课题目	实验一 普通光学显微镜的调试与观察	授课序次	NO.1
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1.学习资源</p> <p>(1) 课件资料:《细胞生物学实验课堂要求》</p> <p>《第一节 普通光学显微镜的调试与观察》;</p> <p>(2) 慕课资源: 中国大学 MOOC, 南京师范大学,《细胞生物学实验》;</p> <p>(3) 视频资源:《显微镜的使用》实验视频;</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1)你知道显微镜都有哪些结构么? 根据经验来回答哦。</p> <p>(2)你知道光路合轴里“光路”作何解释么? 合的“轴”指的是什么?</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况, 排查学生比较核心的知识盲区, 生成讨论区问题, 引导学生进一步解析思考, 产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>显微镜是生命科学研究的基本工具, 细胞生物学实验经常需要使用光学显微镜(以下简称显微镜)观察细胞组织的显微结构。</p> <p>最早的显微镜是 16 世纪末期在荷兰制造出来的。发明者是亚斯·詹森, 荷兰眼镜商, 或者另一位荷兰科学家汉斯·利珀希, 他们用两片透镜制作了简易的显微镜, 但并没有用这些仪器做过任何重要的观察。</p> <p>后来有两个人开始在科学上使用显微镜。第一个是意大利科学家伽利略。他通过显微镜观察到一种昆虫后, 第一次对它的复眼进行了描述。第二个是荷兰亚麻织品商人列文虎克(1632 年-1723 年), 他自己学会了磨制透镜。他第一次描述了许多肉眼所看不见的微小植物和动物。</p> <p>1931 年, 恩斯特·鲁斯卡通过研制电子显微镜, 使生物学发生了一场革命。这使得科学家能观察到像百万分之一毫米那样小的物体。1986 年他被授予诺贝尔奖。</p>			

人的眼睛只能识别大小为 0.1 mm 的物体，显微镜是个精密的特殊s的放大镜，我们用它可以观察肉眼看不见的微小生物的结构。它有专有的结构、成像原理和操作规程。正确显微镜是生物科学专业学生的必备技能之一。如果不了解上述情况，在实验课中不仅不能充分发挥显微镜的设计性能，而且容易发生损坏显微镜和压破盖玻片等事故。

【探究新知】

一、实验原理

（一）显微镜的成像原理：

光线→反光镜→聚光器（遮光器）→通光孔→标本（一定要透明）→物镜的透镜（第一次放大成倒立实像）→镜筒→目镜（再放大成虚像）→眼。

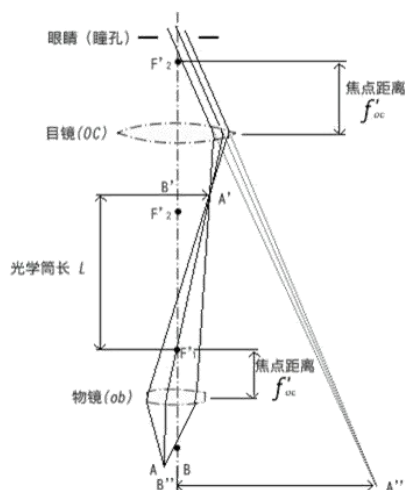


图 1 光学显微镜光路示意图

(二) 光学显微镜的光学系统

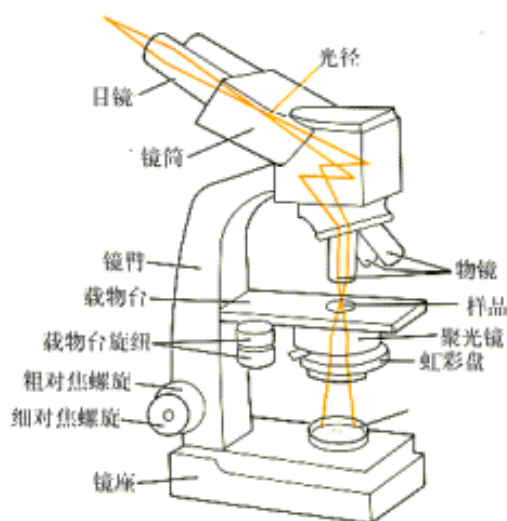


图 2 光学显微镜的基本结构示意图

显微镜的光学系统主要包括物镜、目镜、反光镜和聚光器四个部件。广义的说也包括照明光源、滤光器、盖玻片和载玻片等。

1. 物镜

物镜是决定显微镜性能的最重要部件，安装在物镜转换器上，接近被观察的物体，故叫做物镜或接物镜。物镜的作用是将标本作第一次放大，它是决定显微镜性能的最重要的部件——分辨力的高低。

1.1 物镜的分类

(1) 根据使用条件的不同可分为干燥物镜和浸液物镜；其中浸液物镜又可分为水浸物镜和油浸物镜，常用放大倍数为 90-100 倍。

(2) 根据放大倍数的不同可分为 低倍物镜（10 倍以下）、中倍物镜（20 倍左右）高倍物镜（40-65 倍）。

(3) 根据像差矫正情况，分为消色差物镜（常用，能矫正光谱中两种色光的色差的物镜）和复色差物镜（能矫正光谱中三种色光的色差的物镜，价格贵，使用少）。

1.2 物镜的主要参数

物镜主要参数包括：放大倍数、数值孔径和工作距离。

(1) 放大倍数是指眼睛看到像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。

例：放大倍数为 $100\times$ ，指的是长度是 $1\mu\text{m}$ 的标本，放大后像的长度是 $100\mu\text{m}$ ，要是以面积计算，则放大了 10,000 倍。显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

(2) 数值孔径也叫镜口率，简写 NA 或 A，是物镜和聚光器的主要参数，与显微镜的分辨力成正比。干燥物镜的数值孔径为 0.05-0.95，油浸物镜（香柏油）的数值孔径为 1.25。

(3) 工作距离是指当所观察的标本最清楚时物镜的前端透镜下面到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关，物镜的焦距越长，放大倍数越低，其工作距离越长。

例：10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17，其中 10 为物镜的放大倍数；0.25 为数值孔径；160 为镜筒长度（单位 mm）；0.17 为盖玻片的标准厚度（单位 mm）。10 倍物镜有效工作距离为 6.5mm，40 倍物镜有效工作距离为 0.48mm。

(4) 分辨力也叫分辨率或分辨本领。分辨力的大小是用分辨距离（所能分辨开的两个物点间的最小距离）的数值来表示的。在明视距离（25cm）之处，正常人眼所能看清相距 0.073mm 的两个物点，这个 0.073mm 的数值，即为正常人眼的分辨距离。显微镜的分辨距离越小，即表示它的分辨力越高，也就是表示它的性能越好。

显微镜的分辨力的大小由物镜的分辨力来决定的，而物镜的分辨力又是由它的数值孔径和照明光线的波长决定的。

当用普通的中央照明法（使光线均匀地透过标本的明视照明法）时，显微镜的分辨距离为 $d=0.61\lambda/\text{NA}$

式中 d ——物镜的分辨距离，单位 nm。

λ ——照明光线波长，单位 nm。

NA——物镜的数值孔径

例：油浸物镜的数值孔径为 1.25，可见光波长范围为 400—700nm，取其平均波长 550 nm，则 $d=270\text{ nm}$ ，约等于照明光线波长一半。一般地，用可见光照明的显微镜分辨力的极限是 $0.2\mu\text{m}$ 。

2、目镜（Eyepiece）

它靠近观察者的眼睛，因此也叫接目镜。安装在镜筒的上端。

2.1 目镜的结构

通常目镜由上下两组透镜组成，上面的透镜叫做接目透镜，下面的透镜叫做会聚透镜或场镜。可在其上面放置目镜测微尺，用来测量所观察标本的大小。

2.2 目镜的作用

把物镜放大的实像（中间像）再放大一次，并把物像映入观察者的眼中，实质上目镜就是一个放大镜。尽管目镜可将所观察影像再次放大，但它仍无法看出物镜不能分辨出的结构。只是将已被物镜放大的，分辨清晰的实像进一步放大，达到人眼能容易分辨清楚的程度。

目镜的长度越短，放大倍数越大，目镜的放大倍数与目镜的焦距成反比。常用目镜的放大倍数为 5-16 倍。

2.3 目镜与物镜的关系

物镜已经分辨清楚的细微结构，假如没有经过目镜的再放大，达不到人眼所能分辨的大小，那就看不清楚；但物镜所不能分辨的细微结构，虽然经过高倍目镜的再放大，也还是看不清楚，所以目镜只能起放大作用，不会提高显微镜的分辨率。有时虽然物镜能分辨开两个靠得很近的物点，但由于这两个物点的像的距离小于眼睛的分辨距离，还是无法看清。所以，目镜和物镜即相互联系，又彼此制约。

3、聚光器

聚光器也叫集光器。位于标本下方的聚光器支架上，它主要由聚光镜和可变光阑组成（聚光器升降旋钮，光轴中心调节螺杆）。其中，聚光镜可分为明视场聚光镜（普通显微镜配置）和暗视场聚光镜。

3.1 光镜的主要参数

数值孔径（NA）是聚光镜的主要参数，最大数值孔径一般是 1.2-1.4，数值孔径有一定的可变范围，通常刻在上方透镜边框上的数字是代表最大的数值孔径，通过调节下部可变光阑的开放程度，可得到此数字以下的各种不同的数值孔径，以适应不同物镜的需要。有的聚光镜由几组透镜组成，最上面的一组

透镜可以卸掉或移出光路，使聚光镜的数值孔径变小，以适应低倍物镜观察时的照明。

3.2 聚光镜的作用

聚光镜的作用相当于凸透镜，起会聚光线的作用，以增强标本的照明。一般地把聚光镜的聚光焦点设计在它上端透镜平面上方约 1.25mm 处。此时，聚光焦点正好落在所要观察的标本上，载玻片的厚度为 1.1mm 左右。

3.3 孔径光阑

孔径光阑位于聚光镜的下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔。其作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应。孔径光阑开得越大，数值孔径越大，观察完毕后，应将光圈调至最大。在可变光阑下面，还有一个圆形的滤光片托架。可变光阑（相机的结构）也叫光圈。

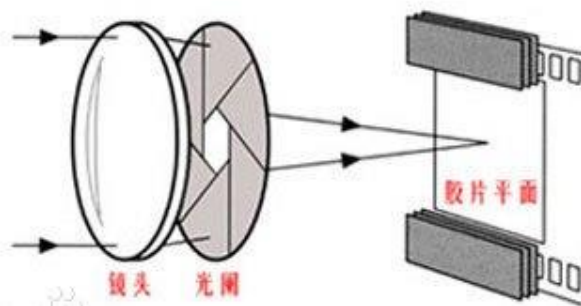


图3 视场光阑示意图

说明：在中学实验室只有教师用显微镜（1600×或 1500×）才配有聚光器，学生用显微镜（640×或 500×）配的是旋转光栏。紧贴在载物台下，能做圆周转动的圆盘，光栏上有大小不等的圆孔，叫光圈。直径分别为 2、3、6、12、16mm，转动旋转光栏，光栏上每个光圈都可以对正通光孔，通过大小不等的光圈来调节光线的强弱。

4. 照明光源

显微镜的照明可以用天然光源或人工光源。

（1）天然光源：光线来自天空，最好是由白云反射来的。不可利用直接照来的太阳光。

注意提醒同学，概念的更迭，如可变光阑、光圈的称呼。

(2) 人工光源：有足够的发光强度；光源发热不能过多。常用的人工光源：显微镜灯；日光灯。光强调节旋钮在镜臂上，显微镜使用完毕，需要将光亮度调制最低，再关闭电源。电源座上的光阑叫做视场光阑，调节光通量。

古老的时候，反光镜是一个可以随意转动的双面镜，直径为 50mm，一面为平面，一面为凹面，可以在水平与垂直两个方向上任意旋转。其作用是将从任何方向射来的光线经通光孔反射上来。平面镜反射光线的能力较弱，是在光线较强时使用，凹面镜反射光线的能力较强，是在光线较弱时使用。观察完毕后，应将反光镜垂直放置。

5. 滤光器

安装在光源和聚光器之间。作用是让所选择的某一波段的光线通过，而吸收掉其他的光线，即为了改变光线的光谱成分或削弱光的强度。分为两大类：滤光片和液体滤光器。

6. 盖玻片和载玻片

(1) 盖玻片和载玻片的表面应相当平坦，无气泡，无划痕。最好选用无色，透明度好的，使用前应洗净。

(2) 盖玻片的标准厚度是 $0.17 \pm 0.02\text{mm}$ ，如不用盖玻片或盖玻片厚度不合适，都会影响成像质量。

(3) 载玻片的标准厚度是 $1.1 \pm 0.04\text{mm}$ ，一般可用范围是 1-1.2mm，若太厚会影响聚光器效能，太薄则容易破裂。

(三) 光学显微镜的机械系统

显微镜的机械装置是显微镜的重要组成部分。其作用是固定与调节光学镜头，固定与移动标本等。主要有镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器、与调焦装置组成。

1. 镜座和镜臂

镜座作用是支撑整个显微镜，装有反光镜，有的还装有照明光源。

镜臂作用是支撑镜筒和载物台。分固定、可倾斜两种。

2. 载物台

又称工作台、镜台，载物台作用是安放载玻片，形状有圆形和方形两种，其中方形的面积为 $120\text{mm} \times 110\text{mm}$ 。中心有一个通光孔，通光孔后方左右两侧各有一个安装压片夹用的小孔。分为固定式与移动式两种。有的载物台的纵横

坐标上都装有游标尺，一般读数为 0.1mm，游标尺可用来测定标本的大小，也可用来对被检部分做标记。

3. 镜筒

镜筒上端放置目镜，下端连接物镜转换器。分为固定式和可调节式两种。机械筒长为从目镜管上缘到物镜转换器螺旋口下端的距离称为镜筒长度或机械筒长，不能变更的叫做固定式镜筒，能变更的叫做调节式镜筒，新式显微镜大多采用固定式镜筒，国产显微镜也大多采用固定式镜筒，国产显微镜的机械筒长通常是 160mm。

安装目镜的镜筒，有单筒和双筒两种。单筒又可分为直立式和倾斜式两种，双筒则都是倾斜式的。其中双筒显微镜，两眼可同时观察以减轻眼睛的疲劳。双筒之间的距离可以调节，而且其中有一个目镜有屈光度调节（即视力调节）装置，便于两眼视力不同的观察者使用。

4. 物镜转换器

物镜转换器固定在镜筒下端，有 3-4 个物镜螺旋口，物镜应按放大倍数高低顺序排列。旋转物镜转换器时，应用手指捏住旋转碟旋转，不要用手指推动物镜，因时间长容易使光轴歪斜，使成像质量变坏。

5. 调焦装置

显微镜上装有粗准焦螺旋和细准焦螺旋。有的显微镜粗准焦螺旋与装在同一轴上，大螺旋为粗准焦螺旋，小螺旋为细准焦螺旋；有的则分开安置，位于镜臂的上端较大的一对螺旋为是粗准焦螺旋，其转动一周，镜筒上升或下降 10mm。位于粗准焦螺旋下方较小的一对螺旋为细准焦螺旋，其转动一周，镜筒升降值为 0.1mm，细准焦螺旋调焦范围不小于 1.8mm。

二、仪器设备

普通光学显微镜、擦镜纸、载玻片、吸水纸、盖玻片、牙签、蒸馏水等。

三、实验步骤

1. 显微镜光轴调节

显微镜在观察时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。所以在显微镜检验前必须进行显微镜光轴的调节，否则不能达到最佳观察效果。

一定要物尽其用。

- (1) 显微镜直立放在离桌面 3-4 公分处；
- (2) 插上电源线，同时打开镜座边缘上的主开关；
- (3) 旋转镜座上的光强调节钮来调节光强度；
- (4) 将载物台升到最高，转动聚光器升降旋钮使聚光器升至顶点位置，孔径光阑最大；
- (5) 向右旋转镜座上的视场光阑至最小，可见边缘模糊的视场光阑图像；
- (6) 微降聚光器，至视野光阑的图象清晰聚焦为止；
- (7) 用聚光器的两个调中螺杆推动聚光器，使缩小的视场光阑图像调至视场中央开放视场光阑，使多边形的周边与视场边缘内切，说明光路已经合轴。若不相接可反复调试几次；
- (8) 缓慢地将视场光阑打开，将聚光器恢复到最高位置。

2. 显微镜的标准使用方法

- (1) 低倍镜观察：镜检任何标本都要先用低倍镜观察，低倍镜视野较广，易于发现目标和确定检查的位置。
- (2) 放置切片：升高镜筒，把玻片标本放在载物台中央，标本材料正对通光孔的中心，用压片夹压住载玻片的两端。
- (3) 调焦：两眼从侧面注视物镜，转动粗准焦螺旋，让镜筒徐徐下降，至物镜距玻片 2~5 mm 处。然后用双眼同时观察，用右手反方向（逆时针方向）转动粗准焦螺旋，使镜筒缓缓上升，直到看清物像为止。如果不够清楚，可用细准焦螺旋调节。（不可以在调焦时边观察边使镜筒下降，以免压碎装片和镜头）
- (4) 高倍物镜观察：视野变小变暗，要重新调节视野亮度，可升高聚光器调亮光源。若用油镜头观察（100*），在低倍镜观察的基础上，滴上一滴香柏油与待观察标本处，再转换物镜，使镜头与香柏油接触，防止压碎玻片，只能微调。用完后，用清洁剂沾纱布把油镜头擦拭干净。
- (5) 还镜：使用完毕，须把显微镜擦干净，将各部分转回原处，并使低倍接物镜转至中央，或者将二个物镜跨于透光孔的两侧，再下降镜筒，使物镜几乎接触载物台为止。再盖好绸布或纱布，把显微镜放回箱内。

3. 口腔上皮细胞装片的制作与观察

- (1) 在一张干净的载玻片上滴一滴清水。
- (2) 清水漱口后，用牙签在口腔内侧轻轻刮几下。
- (3) 将蘸有口腔上皮的牙签在这滴清水中涮几下，然后将水在载玻片上涂匀，面积不要过大，占载玻片的 1/2 即可。
- (4) 待水干后显微镜观察。

【本课小结】

每种显微镜都有实用的领域，但是光学显微镜的成像原理和结构是大同小异的，要学会知识与技能的迁移。

多观察多使用，达到熟练精确使用的状态。

【课后作业】

1. 绘 10 倍或 40 倍镜视野中人口腔上皮细胞图。
2. 显微成像中，图像的放大倍数如何计算。
3. 现有显微镜通过哪些手段可以调节视野亮度。

【知识拓展】

一、显微镜的保养

1、日常维护保养

(1) 防潮：光学镜片就容易生霉、生雾。机械零件受潮后，容易生锈。显微镜箱内应放置 1~2 袋硅胶作干燥剂。

(2) 防尘：光学元件表面落入灰尘，不仅影响光线通过，而且经光学系统放大后，会生成很大的污斑，影响观察。灰尘、砂粒落入机械部分，还会增加磨损，引起运动受阻，危害同样很大。注意保持显微镜的清洁。

(3) 防腐蚀：显微镜不能和具有腐蚀性的化学试剂放在一起。如硫酸、盐酸、强碱等。

(4) 防热：避免热胀冷缩引起镜片的开胶与脱落。因此，生物显微镜要放置在干燥阴凉、无尘、无腐蚀的地方。使用后，要立即擦拭干净，用防尘透气罩罩好或放在箱子内。当显微镜闲置时，用塑料罩盖好，并储放在干燥的地方防尘防霉。将物镜和目镜保存在干燥器之类的容器中，并防些干燥剂。

2、机械系统的维护保养

(1) 滑动部位：定期涂些中性润滑脂，顽固的污迹可以使用软性的清洁剂来清洗，建议使用硅布。

(2) 塑料部分：用软布蘸水就可以清洗了。注意：不要使用有机溶剂

(如酒精, 乙醚, 稀释剂等)。因为会腐蚀机械和油漆, 造成损坏。

3、光学系统的维护保养

(1) 透镜的清洁: 使用后用干净柔软的绸布轻轻擦拭目镜和物镜镜片。有较顽固的污迹, 可用长纤维脱脂棉或干净的细棉布蘸少些二甲苯或镜头清洗液(3份酒精:1份乙醚)擦拭, 然后用干净细软的绸布擦干。

注意: 清洗液千万不能渗入到物镜镜片内部, 否则会损坏物镜镜片。纯酒精和二甲苯容易燃烧, 在将电源开关打开或关闭时要特别当心不要引燃这些液体。

(2) 物镜和目镜的生霉生雾的处理办法: 准备 30%无水乙醇+70%乙醚, 将不同镜头单独分开放置干燥剂器皿中, 最好用棉花棒, 纱布, 柔软的刷子等比较柔软的东西来擦拭油镜当时就要清洗。特别是 100X 的油镜, 处理不当的话, 前片容易浸油或开胶。目镜可以自己拆下来清洗, 16X 目镜注意别装反了, 前片凹面在上。物镜不要随便拆下。

注意: 擦洗镜头时, 不能过用力, 以防止损伤镀膜层。一般 2 个月最好能集中保养一次。显微镜多时, 各个镜头要标号以免弄错了搭配。

4、定期检查:

为了保持性能的稳定, 建议做定期的检查, 保养。综上所述, 对于生物显微镜的维护保养, 主要做到防尘、防潮、防热、防腐蚀。用后及时清洗擦拭干净, 并定期在有关部位加注中性润滑油脂。对于一些结构复杂, 装配精密的零部件, 如果没有一定的专业知识, 一定的技能和专用工具, 就不能擅自拆装, 以免损坏零部件。

二、显微镜的发展史

1.显微镜的早期应用

19 世纪由于显微镜的发明, 植物解剖研究也得到复活。虎克, 马尔比基, 雷文雷克等都曾用显微镜观察到植物细胞, 但他们对细胞的理解还没有上升到系统学说的程度。

1831 年一个伦敦医生发现植物细胞具有细胞核; 捷克人浦肯野观察到了母鸡卵中胚核, 这些结果由耶拿大学的植物学家马提阿斯·施莱登总结为细胞学说, 即细胞是一切植物的基本生命单位。奥多尔·施旺于 1939 年将细胞学说扩展到动物界, 即细胞是一切生命的基本活动单位。细胞学说被恩格斯称为 19 世纪的三大发明之一, 这里充分说明了显微镜作为研究手段对现代生物学和自然科学研究的推动作用。

染料的发现和广泛应用提高了显微镜的对比度, 使原来看不到的生物结构在显微镜下变得清晰可见。约瑟夫·格拉克(Joseph Von Gerlach)最早在 1858

年用胭脂红(Carmine)溶液对脑组织染色，格拉克发现不同细胞组份对染料有不同吸收。1873年卡密罗·高尔基(Camillo Golgi，他不是苏联文学学家马克西姆·高尔基)开创了银染的方法，圣地亚哥·拉蒙-卡哈尔(Santiago Ramón y Cajal)用高尔基的染色方法开创了大脑微观结构的研究，卡哈尔精于素描，他的很多作品直到现在还在使用。

荧光染料的出现极大的提高了对比度，然而荧光显微镜的发展却落后于荧光染料，正如宝剑在手却苦于没有用剑的高手。1871年约翰·弗雷德里克·威廉·阿道夫·冯·拜尔(Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer)首先分析出吡啶结构并合成荧光素(fluorescein)，因此获1905年诺贝尔化学奖。1961年阿尔伯特·库恩斯(Albert Coons)将荧光素藕联到抗体上，抗体只结合特异性的抗原分子，不仅提高了标记的特异性，又因为荧光染料的应用提高了对比度，开创了免疫荧光显微镜的新纪元。

1962年Shimomura发现了绿色荧光蛋白，绿色荧光蛋白基因1992被Prasher克隆出来。1995年华裔诺贝尔奖得主钱永健发现了一个荧光更强，光稳定更好的突变体。钱永健的突变体将激发光波长从紫外延展到了488nm的可见光区间，从1994年开始绿色荧光蛋白被广泛用于细胞内蛋白质的定位和表达。

2.显微镜在20世纪早期的发展

1903年奥地利籍匈牙利裔化学家里夏德·阿道夫·席格蒙迪(Richard Adolf Zsigmondy)发明了超显微镜，用来观察气体或胶体中的粒子。席格蒙迪命名为超级，因为它可以研究尺度在波长以下的物体，超的意思就是超出了波长的限制，而不是超级的意思，并于1925年获得了诺贝尔化学奖。

席格蒙迪1897年加入了由Abbe与肖特(Schott Glaswerke AG)成立的肖特玻璃制造厂，在该厂工作期间，席格蒙迪对茶色玻璃进行了研究，还发明了一种玻璃，命名为“Jenaer Milchglas”。1890年席格蒙迪辞职，与蔡司合作研制了狭缝超显微镜，席格蒙迪可以测出玻璃中4纳米的颗粒。1907年他进入格丁根大学，成为有机化学教授，直至1929年2月退休，席格蒙迪一生的主要成就在于确立了现代胶体化学的基础。

1932年弗里茨·塞尔尼克(Frits Zernike)发明了相位差显微镜来研究无色和透明的生物样品，这样细胞不再需要染色，塞尔尼克因此获得了1953年诺贝尔物理学奖。然而在相位差显微镜刚被发明时并没有得到足够多的重视，塞尔尼克与蔡司公司讨论过合作的可能性，但蔡司当时不敢兴趣。直到二次世界大战时塞尔尼克被纳粹党逮捕，媒体的报道将塞尔尼克再次推倒前台，相位差

显微镜才得到重视。塞尔尼克的侄子 Gerardus't Hooft 也是著名的物理学家，Hooft 解释了电弱相互作用的量子结构而获得 1999 年诺贝尔物理奖。

极化/偏振显微镜(polarization microscopy)也是一种非标记技术，由德国物理学家马克·贝雷克(Mark Berek)在二次世界大战前发明，具体年月不详。虽然当时人们已经开始使用荧光显微镜，但因为荧光显微镜的样品需要固定染色，所以荧光显微镜观察到的亚细胞结构存在很大争议，很多人认为那是染料造成的假象，非标记显微镜观察到的结构更容易获得认可。W.J.Schmid 在 1937 年观察到了纺锤体的纤维状结构，但图像有些模糊不清。1953 年 Shinya Inoué 用自制的改进型偏振显微镜证实了 Schmid 的发现，通过与荧光显微镜的结果比较，二者结果相似，这也在一定程度上推动了荧光显微镜的发展。

20 世纪 50 年乔治·诺马尔斯基(Georges Nomarski)发明了微分干涉相衬显微镜(differential interference contrast)，微分干涉相衬显微镜可以用来研究非染色的活生物样品。微分干涉相衬显微镜要求透明样品的折射率与样品所处的介质环境相同，而且不能研究厚的或者有色素的样品，但微分干涉相衬显微镜的分辨率在合适的条件下可以比相位差显微镜更高。Allen 1981 年将摄像机(video camera)技术与微分干涉相衬显微镜整合成视频增强对比微分干涉相衬显微镜(Video-enhanced Contrast, Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) microscopy)，当然摄像机也可以与偏振显微镜整合成视频增强对比偏振显微镜(Video-enhanced Contrast Polarization Microscopy)。

1940 年西奥多·弗斯特(Theodor Förster)发现了荧光共振能量转移现象(fluorescence resonance energy transfer, FRET)，弗斯特证实电子激发能量能够从荧光供体(donor fluorescence)转到荧光受体(acceptor chromophore)，转移的效率与分子距离的六次方的倒数相关。FRET 显微镜可以用来研究蛋白在体内的相互作用，1996 年韩国学者 Taekjip Ha 首次实现了单分子 FRET，目前单分子 FRET 可以在体外实时研究分子相互作用和分子动态变化。

3. 电子显微镜的发展

电子显微镜的发展却是建立在光学显微镜的基础上，在现代科学发展的历史中，两个看似无关的学科互相融合往往产生意想不到的结构。可见光的分辨率极限是 0.2 微米，小于 0.2 微米的结构在普通光学显微镜下是无法识别的。提高显微镜分辨率的途径之一是设法减小光的波长，或者用电子束来代替光。根据德布罗意的物质波理论，运动的电子具有波动性，而且速度越快，“波长”就越短。如果能把电子的速度加到足够高，用磁场聚焦电子束，就有可能用电子束来放大物体。

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，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，大概是当时光学显微镜分辨率的十倍，于是电子显微镜开始受到人们的重视。

二十世纪 40 年代，美国人希尔用消像散器克服了电子透镜旋转不对称性的负面影响，使电子显微镜的分辨本领有了新的突破，逐步达到了现代电子显微镜的水平。

我们国家的科研工作者高瞻远瞩紧跟世界科研潮流，在 1958 年成功研制出透射式电子显微镜，分辨本领为 3 纳米，1979 年又制成分辨本领为 0.3 纳米的大型透射电子显微镜。由于分辨率太低而且电子束对样品损伤严重，此时的电子显微镜并不适合去观测单个分子。随着上世纪 80 年代扫描隧道显微镜和原子力显微镜的问世，在表面上检测单个原子或分子终于成为可能。

1952 年，英国工程师 Charles Oatley 制造出了第一台扫描电子显微镜 (SEM)，电子显微镜被认为是 20 世纪最重要的发明之一。很多在可见光下看不见的物体——例如病毒——在电子显微镜下都现出了原形。

1983 年，IBM 公司苏黎世实验室的两位科学家 Gerd Binnig 和 Heinrich Rohrer 发明了扫描隧道显微镜 (STM)。这种显微镜比电子显微镜更加激进，它完全失去了传统显微镜的概念。扫描隧道显微镜的工作原理是“隧道效应”。隧道扫描显微镜没有镜头，它使用一根探针。探针和物体之间加上电压，如果探针距离物体表面很近——大约在纳米级的距离上——隧道效应就会起作用。电子会穿过物体与探针之间的空隙，形成一股微弱的电流。如果探针与物体的距离发生变化，这股电流也会相应的改变。这样，通过测量电流我们就能知道物体表面的形状，分辨率可以达到单个原子的级别。因为这项奇妙的发明，Binnig 和 Rohrer 获得了 1986 年诺贝尔物理学奖，电子显微镜的发明者 Ruska 在同一年与他们共享了诺贝尔物理学奖。

电子显微镜在细胞生物学中的应用奠定了现代细胞生物学的基础，很多细胞的超微结构都是在电子显微镜的帮助下实现的。20 世纪后半段是电子显微镜发展的黄金期，比如罗马尼亚出生的美国细胞生物学家乔治·埃米尔·帕拉德 (George Emil Palade) 借助电子显微镜的帮助在 1955 年发现了核糖体，核糖体是细胞内蛋白质翻译的工厂，核糖体的发现对我们认识细胞功能迈出了重大的一步，因此帕拉德于 1974 年被授予诺贝尔医学奖。工欲善其事必先利其器，帕拉德的贡献就是拜电子显微镜所赐。

虽然电子显微镜的分辨本领早已远胜光学显微镜，但因为电子显微镜要在真空条件下工作，所以很难观察活生物，而且电子束照射会使生物样品受到辐照损伤。

教学反思

1. 要注重学生已有知识的迁移，留意学生已有操作习惯的缺陷，注意矫正，并在现有操作时间内，形成标准的操作习惯。
2. 注意培养学生利用显微镜观察微观样本的习惯和方法。循序渐进的帮助学生习惯在显微镜下耐心、细心的进行观察。

实验二 暗视野显微镜的制作与使用

实验目的	(1) 掌握暗视野显微镜的工作原理及使用方法； (2) 了解暗视野显微镜的观察特点；
学习重点	(1) 理解暗视野显微镜的成像原理；
学习难点	(1) 理解暗视野显微镜的实际应用；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上”+“线下”混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究、文献调研、团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[普通光学显微镜及暗视野显微镜的使用] --> B[光学显微镜] A --> C[暗视野显微镜] B --> D[结构和功能] B --> E[光路合轴原理和标准化操作] C --> F[成像原理] C --> G[成像特点] C --> H[制作暗视野成像效果] E --> I[人口腔上皮细胞标本制作与观察] H --> J[浮游生物（剑水蚤）的观察] </pre>

授课题目	实验二 暗视野显微镜的制作与使用	授课序次	NO.2
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1.学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第二节 暗视野显微镜的制作与使用》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《显微镜的使用》实验视频；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 暗视野显微镜成像的时候，是否需要光？眼睛为什么通过暗视野显微镜仍然可以看到被观察物体？</p> <p>(2) 在暗视野显微镜的制作过程中，如果黑纸片剪的不圆，如有缺口，会观察到什么样的现象？请线下验证你的观点。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>暗视野显微镜（dark field microscope）是光学显微镜的一种，也叫超显微镜（ultramicroscope）。暗视野显微镜的聚光镜中央有挡光片，使照明光线不直接进入物镜，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的。利用这种显微镜能见到小至 4~200nm 的微粒子，分辨率可比普通显微镜高 50 倍。</p> <p>暗视野显微镜常用来观察未染色的透明样品。临床上，暗视野显微镜常用于检查苍白螺旋体。这是一种病原体检查，对早期梅毒的诊断有十分重要的意义。</p> <p>【探究新知】</p> <p>一、实验目的</p> <p>了解暗视野显微镜的工作原理和使用方法</p> <p>二、实验原理</p>			

暗视野显微镜就是利用光学上的丁达尔原理设计的。利用暗视野聚光器使入射光束从聚光器斜向照明样品，使之发出反射和散射光。由样品发出的散射光和反射光形成了明亮的物体影象，背景是黑暗的。

它的结构特点主要是使用路面遮光板或暗视野聚光器，使光源的中央光速被阻挡，不能由下而上地通过标本进入物镜，因而整个视野是黑暗的，在暗视野中所观察到的是被检物体的衍射图像，并非物体的本身，所以只能看到物体的存在和运动，不能辩清物体的细微结构。

当被检物体为非均质时，并大于 $1/2$ 波长，则各级衍射光线同时进入物镜，在某种程度上可观察物体的构造，一般暗视野显微镜虽看不清物体的细微结构，但却可分辨 $0.004\mu\text{m}$ 以上微粒的存在和运动，这是普通显微镜(最大分辨力为 $0.2\mu\text{m}$)所不具有的特性，可用以观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

三、仪器设备

明视野显微镜， 黑纸片， 遮光器，浮游生物

四、实验步骤

普通显微镜只要聚光器是可以拆卸的，支架的口径适于安装暗视野聚光器，即可改装成暗视野显微镜，在无暗视野聚光器时，可用厚黑纸片制作一个中央遮光板，放在普通显微镜的聚光器下方的滤光片框上，也能得到暗视野效果。

- (1) 将显微镜聚光器调到最高位置，用低倍镜对好焦距；
- (2) 取下目镜，从镜筒中观察并调节光阑的大小，使其与镜筒中所见物镜的视野相等；
- (3) 用厚黑纸剪制中央挡光板，大小与调节好的视场光阑一样；
- (4) 遮光器放在光源架上，中央挡光板放在遮光器中央；
- (5) 找到所需观察的物像并采集图像。

【讨论提问】

通过实验观察，对比分析暗视野显微镜与光学显微镜的成像区别。

【本课小结】

每种显微镜都有实用的领域，但是光学显微镜的成像原理和结构是大同小异的，要学会知识与技能的迁移。

可用半透明的小纸片，放在通光孔处聚光镜镜面上，纸上显示的光斑即为光阑的孔径，再用圆规量取大小

<p>【课后作业】</p> <p>(1) 对浮游生物进行暗视野效果观察。</p> <p>(2) 对比观察普通光学显微镜和暗视野显微镜观察浮游生物图像的差别。</p> <p>(3) 如果挡光板制作的时候出现残缺的瑕疵，是否会影响观察效果？举例说明。</p>	
<p style="text-align: center;">教学反思</p>	
<p>3. 要注重学生已有知识的迁移，留意学生已有操作习惯的缺陷，注意矫正，并在现有操作时间内，形成标准的操作习惯。</p> <p>4. 注意培养学生利用显微镜观察微观样本的习惯和方法。循序渐进的帮助学生习惯在显微镜下耐心、细心的进行观察。</p>	

实验三 细胞膜的渗透性及意义

实验目的	(1) 理解血细胞测试细胞膜选择透过性的原理； (2) 通过单盲实验，理解实验误差产生的原因，认真对待科学研究的严谨性；
学习重点	(1) 通过组间数据对比，分析了解实验误差产生的原因，进而规范个人实验操作；
学习难点	(1) 通过实验原理的解读，对预设实际进行溶血速度的预判，并开展单盲实验；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上”+“线下”混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[细胞膜的渗透性及意义] --> B[细胞膜] A --> C[渗透作用] B --> D[流动性] B --> E[选择透过性] C --> F[等渗溶液] C --> G[溶血现象] G --> H[判定不同物质进出细胞膜的速度] </pre>

授课题目	实验二 细胞膜的渗透性及意义	授课序次	NO.3
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料:《第三节 细胞膜的渗透性及意义》</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 不同物质进出细胞膜的速度一样么?</p> <p>(2) 什么叫溶血?</p> <p>(3) 把鸡红细胞放在其等渗溶液里, 鸡红细胞还是发生溶血了, 为什么?</p> <p>【备注: 等渗溶液, 指的是渗透量相当于血浆渗透量的溶液。如 0.9%NaCl 溶液和 5%葡萄糖溶液】</p> <p>(4) 溶血现象为什么能判断物质的进出速度?</p> <p>(5) 本实验为什么一定要采用血细胞? 采用其它细胞可不可以?</p> <p>(6) 以下三组试剂, ① 请判断第一组实验现象, 解释原因; ②第二组和第三组组内试剂溶血发生的速度, 并写出判断原因。记得在课堂实验中验证自己的推断哦。</p> <p>一组: 水, 2%曲拉通;</p> <p>二组: 5 mmol/l、65 mmol/l、150 mmol/l 的 Nacl 溶液;</p> <p>三组: 0.8mol/l 的甲醇、乙醇、乙二醇、丙三醇;</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况, 排查学生比较核心的知识盲区, 生成讨论区问题, 引导学生进一步解析思考, 产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>案例 1: Pepsi Challenge: 一个市场营销人员拿着若干杯饮料, 每个杯子都贴着 A 或者 B。若干杯中有一些是可口可乐, 另一些是百事可乐, 营销人员知</p>			

道那些杯子里是可口可乐，哪些是百事可乐，但是并不向参与者透露。参与者被要求品尝两杯饮料然后选择出他们更喜爱哪种。

案例 2：双盲试验中，作为试验对象的病人和作为试验参与者（或观察者）的医务人员都不知道（双盲）谁被给予了新药，谁被给予了安慰剂。这样，医务人员对病人服药以及服安慰剂这两种结果的观察就会更加客观，因而对新药实际效果的解释也就会更准确、更科学。

案例 3：如果研发一种护肤品或者体外用药，哪种品质更容易被消费者接受。

【探究新知】

一、实验目的

1. 理解细胞膜的渗透性及其意义；
2. 自主设计实验，测试各种物质进入红细胞的速度；

二、实验原理

细胞膜具有对物质选择透过的生理功能。如果将红细胞放置在各种溶液中，根据红细胞质膜对各种溶质的渗透性不同，有的溶质可渗入，有的溶质不能渗入。即使能渗入，速度也有差异。可通过观察红细胞溶血现象时间的不同来记录渗入速度。

生物膜对小分子的跨膜渗透包括水、电解质和非电解质溶质。人工合成的脂质体主要用来研究细胞膜的渗透性及各类物质进入细胞的速度。根据人工不含蛋白质的磷脂双分子层研究物质通透性质表明，只要时间足够长，任何分子都能顺浓度梯度扩散通过脂双层。但不同分子通过脂双层扩散的速率差别很大，主要取决于它们在脂类和水之间的分配系数及其分子的大小。分子越小，分配系数越大，通过质膜的速率越快。

例：

小的、亲脂性的、非极性分子（如 O_2 、 CO_2 、 N_2 、苯）容易溶解于脂双层，可迅速透过脂双层；

小的、不带电荷的极性分子（如水、脲、甘油等）如果足够小，也能很快透过脂双层；

大的、不带电荷的极性分子（如葡萄糖，蔗糖等）可以跨膜扩散运输，但比较困难；

对于带电荷的分子或离子，由于这些分子的电荷及高的水化度，因此不管多小，都很难透过脂双层的疏水区，它们要通过载体介导的主动运输方式跨膜运输。

血红蛋白从红细胞中逸出的现象称为溶血现象。渗入红细胞的溶质能提高红细胞渗透压，使水进入红细胞，引起溶血及细胞膜破裂。此时光线较容易通过溶液，使溶液呈现透明即为溶血。由于溶质透入速度不同，溶血时间也不同。因此，可通过溶血现象来测量各种物质通透性的差别。

三、实验材料

Alever 溶液抗凝保存的鸡血红细胞、10 个玻璃试管、试管架、10 个滴管、记号笔；

试剂：

一组：水、150 mmol/l NaCl、2%曲拉通

二组：5 mmol/l NaCl、65 mmol/l NaCl,

三组：0.8mol/l 甲醇、乙醇、乙二醇、丙三醇，

四、实验步骤

(1) 鸡血细胞悬液：取 50ml 小烧杯一只，加一份鸡血和 10 份 0.17mol/L 氯化钠溶液，形成一种不透明的红色液体，此即稀释的羊血。

(2) 鸡红细胞渗透性的测定

A 管：1ml 稀释的羊血+水 10ml；

B 管：1ml 稀释的羊血+ 10ml 0.17mol/L 氯化钠

C 管： 1ml 稀释的羊血+10ml 0.17mol/L 氯化铵

另外 8 种等渗溶液中进行同样实验。

(3) 观察现象

轻轻摇动，注意观察颜色有无变化？

有无溶血现象？若发生溶血，记下时间（自加入稀释羊血到溶液变成红色透明澄清所需时间）。

(4) 对比分析细胞膜针对不同物质的渗透性。

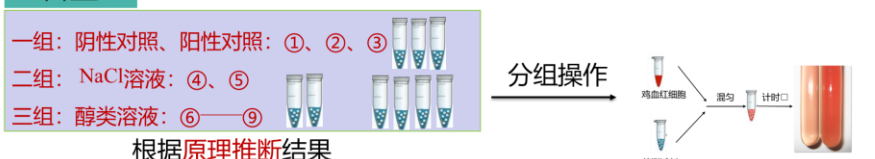
“盲盒”

一组：阴性对照、阳性对照：①、②、③

二组：NaCl溶液：④、⑤

三组：醇类溶液：⑥——⑨

根据原理推断结果

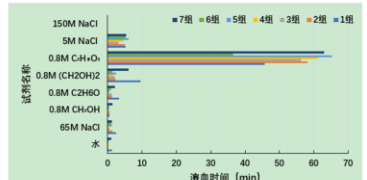


分组操作

鸡血红细胞 + 待测试剂 → 混合 → 计时口

根据计时结果进行判断

共享结果



数据分析，讨论原因

试剂名称	溶血时间 (s)	按极性、分子大小等角度进行分析原因分析

【讨论提问】

1. 试分析水进入红细胞膜的速度是由于扩散吗?如果不是，如何证明?

答：不是。因为水进入红细胞的速度很快，而渗透作用不能这么快。红细胞膜上存在水通道，控制水的进出。

证明方法：可以用同位素标记的方法，将水通道蛋白标记，如果发现其中有水通过，说明水不是仅仅通过渗透作用进入细胞的。

2. 为什么溶液中微量的去垢剂可对活细胞产生严重的影响?

答：因为去垢剂是一些具有亲水的极性基团和疏水的非极性基团的长链分子。非离子型去垢剂如 TritonX-100((聚乙二醇辛基苯基醚))可与脂双层形成混合微团，它们主要与蛋白质疏水部位相互作用，一般不会引起蛋白质变性。而离子型去垢剂与蛋白结合后可改变蛋白质结构，使之变性，尤其是加热后可使蛋白质解离为单体，如十二烷基磺酸钠（SDS）等。多种去污剂可以溶解细胞膜上的磷脂化合物，从而使细胞膜破裂，释放出细胞内物质。

【本课小结】

利用溶血实验测试不同物质进出细胞膜的速度，理解细胞膜选择透过性的特殊性。

【课后作业】

分析讨论不同物质进出细胞膜的速度，并解释原因。

1. 蒸馏水和曲拉通

试剂	曲拉通	蒸馏水
变化	溶血，溶液红色透明	溶血，溶液红色透明
溶血时间	10s 以内	1s 以内

显微观察	无完整的红细胞，有絮状物质	无完整的红细胞，有絮状物质	
-------------	---------------	---------------	--

结论：非离子型去垢剂 TritonX-100((聚乙二醇辛基苯基醚))可与脂双层形成混合微团，主要与蛋白质疏水部位相互作用，不会引起蛋白质变性，抽提细胞膜蛋白质，细胞膜结构破坏发生溶血，而 H₂O 可以很快地进入细胞内，使细胞膨胀溶血。

2. 不同浓度的 NaCl

试剂	5 mmol/L	65 mmol/L	150 mmol/L
变化	迅速溶血	溶血	不溶血，静置后分层，上层无色透明，下层红色不透明。
溶血时间	5s	10s	
显微观察	无完整红细胞，絮状物质，少量血影细胞	无完整红细胞，有血影细胞	完整的红细胞

结论：Na⁺和 Cl⁻不能以自由扩散方式通过细胞膜，0.15mol/L NaCl 不能导致溶血；150 mmol/L NaCl 溶液与羊血细胞是等渗溶液，所以不能溶血，5 mmol/L NaCl 与 65 mmol/L NaCl 溶液为低渗溶液，能够是红细胞吸水涨裂。浓度越低，与细胞的渗透压相差越大，渗透作用越强，越容易发生溶血。

3. 相同浓度(0.8 mol/L)的甲醇，乙醇，丙醇

试剂	甲醇	乙醇	丙醇
变化	溶血	溶血	溶血
溶血时间	7s	10s	12s
显微观察	无完整红细胞，有絮状沉淀，血影细胞	无完整红细胞，有絮状沉淀，血影细胞	无完整红细胞，有絮状沉淀，血影细胞

结论：血细胞在相同浓度的甲醇，乙醇，丙醇中都能溶血，但是时间不同，随着分子量的增加，分子增大，溶血时间增长，这说明溶血时间的长短不但与分子的极性有关，还与分子的大小有关。

4. 相同浓度(0.8 mol/L)的丙醇，丙二醇，丙三醇

试剂	丙醇	丙二醇	丙三醇
变化	溶血	溶血	长时间放置后溶血
溶血时间	12s	20s	30min
显微观察	无完整红细胞，可观察到血影细胞	无完整红细胞，絮状物质，可观察到血影细胞	溶血 无完整红细胞

结论：丙醇，丙二醇，丙三醇都是极性分子，都能使红细胞溶血，但是丙三醇的分子较大，所以溶血时间较长。

【知识拓展】

细胞膜具有选择透过性功能，果蔬细胞之间以及细胞与外界环境之间发生的一切物质交换都必须通过质膜进行。果蔬细胞膜对维持细胞的微环境和正常

的代谢起着重要的作用。果蔬组织后熟衰老过程中，细胞质膜功能活性下降，膜通透性增加，出现细胞内电解质向外渗漏。植物组织在受到各种不利的环境条件（如干旱、低温、高温、盐渍和大气污染）危害时，细胞膜的结构和功能首先受到伤害，细胞膜透性增大。若将受伤害的组织浸入无离子水中，其外渗液中电解质（主要是钾离子）的含量比正常组织外渗液中含量增加，组织受伤害越严重，电解质含量增加越多。通过测定果蔬组织浸提液或外渗液的电导率，可以了解果蔬细胞膜通透性变化，反映果蔬抗逆性强弱或受到伤害的程度。一般利用相对电导率表示细胞膜渗透率以及细胞膜受到伤害的程度。在电解质外渗透的同时，细胞内可溶性有机物也随之渗出，引起外渗液可溶性糖、氨基酸、核苷酸等含量增加，氨基酸和核苷酸对紫外光有吸收，用紫外分光光度计测定受伤害组织外渗液消光值，同样可反映出质膜受伤害的程度。

以下基本概念需了解：

hemolysis（溶血现象）：渗入红细胞的溶质能提高红细胞的渗透压，使水进入细胞，引起细胞吸水胀破；即红细胞膜破裂，血红蛋白从红细胞中逸出的现象称为溶血现象。

isotonic solution（等渗溶液）：渗透压与血浆渗透压相等的溶液称为等渗溶液。

Hypertonic solution（高渗溶液）：渗透压高于血浆渗透压的溶液称为高渗溶液。

Hypotonic solution（低渗溶液）：渗透压低于血浆渗透压的溶液称为低渗溶液。

semipermeable（半透性）：膜或膜状结构只允许溶剂（通常是水）或部分溶质（一般为小分子物质）透过，而不允许其他溶质（一般为大分子物质）透过的特性。

osmosis（渗透作用）：膜两侧溶液浓度存在差异，造成化学势能差，在势能差的驱动下，溶剂穿过对溶质不透膜的过程

教学反思
<ol style="list-style-type: none">1. 注意培养学生实验操作的严谨性，特别是这种涉及到具体数据的情况，人为因素影响比较明显，引导学生如何避免误差的出现。2. 提供相对开放的实验设计，鼓励学生根据自己的兴趣，设计检测物质，开展创新性实验。

实验四 液泡系及线粒体的活体染色与观察

实验目的	<p>(1) 掌握细胞器超活染色的原理及应用领域。</p> <p>(2) 利用詹纳斯绿 B 染色，观察线粒体的基本形态与分布。</p> <p>(3) 利用中性红染色，观察植物液泡的形态与分布。</p>
学习重点	<p>(1) 总结归纳不同超活染色的原理区别；</p> <p>(2) 自主探究超活染色的应用领域；</p>
学习难点	(1) 超活染料与细胞器之间的匹配，才能实现超活染色，理解其实验设计理念。
学时分配	4 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学 + 现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[液泡系及线粒体的活体染色与观察] --> B[活体染色] A --> C[细胞器] B --> D[超活染色] B --> E[体内染色] C --> F[液泡] C --> G[线粒体] F --- H[中性红染色] G --- I[詹纳斯绿B] </pre>

授课题目	实验四 液泡系和线粒体的活体染色	授课序次	NO.4
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第四节 液泡系和线粒体的活体染色》</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 液泡长啥样？一个细胞里有几个？多大？干啥用的？</p> <p>(2) 线粒体长啥样？一个细胞里有几个？多大？干啥用的？</p> <p>(3) 不同组织来源细胞的线粒体数量差别很大，请问这种数量级上的差别与细胞的哪种行为有关。</p> <p>(4) 如果植物细胞用中性红染色后，发现细胞核是红色，其他地方没有着色，说明了什么状况？</p> <p>(5) 人口腔细胞线粒体超活染色的时候，为什么要将涂片放在 37℃ 条件下进行染色？植物细胞线粒体染色也需要 37℃ 条件么？</p> <p>(6) 请调研一种活体染色技术，简单说明其原理及应用。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>活体染色是指一个活的动物或植物的细胞或组织被染色。活体染色分为体内活体染色和体外活体染色，活染技术通常可用来研究生活状态下的细胞形态结构和生理、病理状态。</p> <p>【案例 1】</p> <p>评估角膜接触镜符合性：配戴角膜接触镜之前，需在角膜上滴荧光素钠溶液，观察是否有角膜损伤，是否适宜配戴角膜接触镜。配戴片刻后取下接触镜。通过裂隙灯钴蓝片观察角膜，在接触镜接触角膜的地方是否染色，检查角膜接触镜是否合适。</p>			

【案例 2】

临床上用 0.5% 或 1.0% 虎红溶液染色检测和评估 KCS、角膜上皮树枝状溃疡、点状角膜炎、睑板腺功能障碍、暴露性角膜炎等。泪液缺乏可导致眼表上皮细胞的改变，虎红眼表染色，角结膜暴露部分呈点状着染。

所以我们可以推断，活体染色的对象是有生命力的，染料必须无毒无伤害性，还能特异性显色，那么今天我们试着超活染色一下液泡和线粒体。

【探究新知】**一、实验目的**

1. 掌握细胞器超活染色的原理及应用。
2. 利用詹纳斯绿 B 染色，观察线粒体的基本形态与分布。
3. 利用中性红染色，观察植物液泡的形态与分布。

二、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没有毒害的一种染色方法。它的目的是显示细胞内的某些结构而不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学的变化。

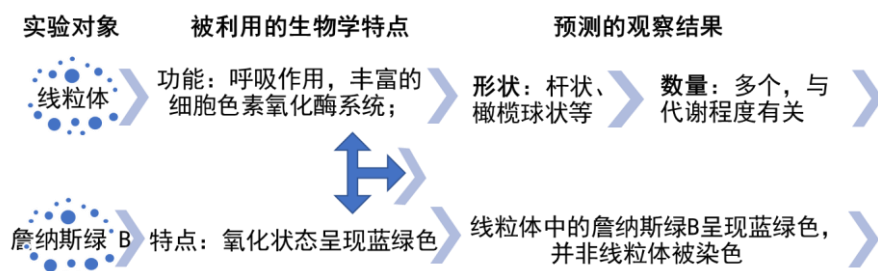
根据染色剂的性质和染色方法的不同，可以将染色分为体内活染色和体外活染色。体内活染色是以胶体状的染料溶液注入动植物体内，染料的胶粒固定、堆积在细胞内某些特殊结构里。体外活体染色又称超活染色，由活的动植物分离出的部分细胞或组织小块，以染料浸染，染料被选择固定在活细胞的某些结构上而着色。

一般的生物材料不能穿透细胞膜，只有当细胞被固定后，细胞膜被破坏，染料才能进入细胞内部。但是，“活体染料”却能进入活细胞，它们是一些无毒或毒性很小的染色剂，能使细胞中某些特定结构着色。活体染料基本上不影响或很少影响细胞的生命活动。

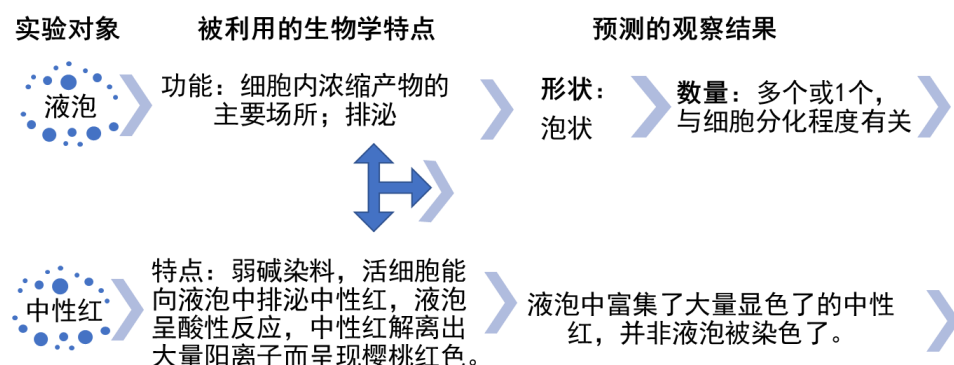
活体染料与细胞作用，主要是染料电化学作用。碱性染料的胶粒表面带阳离子，酸性的带阴离子，从而与细胞被染部分结合。一般对细胞无毒或毒性极小，并配成稀淡的溶液来使用。活体染料多为碱性染料，如中性红、詹纳斯绿、次甲基蓝、甲苯胺蓝、亮焦油紫等，它们解离后带正电，其中有的染料与胞内某些结构有专一性接合。

【实验原理剖析】

1. 线粒体的超活染色



2. 液泡的超活染色



三. 实验试剂与材料

人口腔上皮细胞，洋葱表皮细胞、牙签，载玻片，盖玻片，吸水纸，水浴锅。

Ringer 溶液：氯化钠 0.85g（变温动物用 0.65g）、氯化钾 0.25g 、氯化钙 0.03g 、蒸馏水 100ml）

10%、1/3000 中性红溶液：称取 0.5 中性红溶于 50ml Ringer 溶液，稍加热（30~40 度）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。临用前，取已配制的 1%中性红溶液 1ml，加入 29ml

Ringer 溶液混匀，装入棕色瓶备用。

1%、1/5000 詹姆斯绿 B 溶液：称取 50mg 詹姆斯绿 B 溶于 5ml Ringer 溶液中，稍加 微热（30~40 度）使之溶解，用滤纸过滤后，即为 1%原液。取 1%原液 1ml 加入 49ml Ringer 溶液，即成 1/5000 工作液，装入瓶中备用。最

好现用现配，以保持它的充分氧化能力。

四. 实验步骤

1. 线粒体的超活染色

(1) 取清洁载玻片放在 37℃ 恒温水浴锅的金属板上，滴 2 滴詹纳斯绿 B 染液；

(2) 刮取口腔上皮细胞（洋葱表皮），放入载玻片的染液滴中，染色 10~15min；

(3) 盖上盖玻片，用吸水纸吸去四周溢出的染液，置显微镜下观察；

2. 液泡的超活染色

(1) 取清洁载玻片，滴 2 滴中性红染液；

(2) 洋葱表皮浸没在中性红中，常温孵育 10min；

(3) 吸走多余染液，滴加 Ringer 液；

(4) 盖上盖玻片，用吸水纸吸去四周溢出的染液，置显微镜下观察；

【讨论提问】

1. 中性红染色实验中，活细胞细胞质和细胞核是不着色的。如果细胞死亡，会有什么样的观察效果，原因？

细胞核为红色，液泡失去排泌功能，中性红在细胞中弥散开来，由于细胞核为致密的结构，着色为红色。

2. 在超活染色中，除了要注意染液的无毒无害原则之外，我们实验的成败还取决于哪些关键因素？

保持最大的生物活性。所以整个实验中不能干片，试验速度要快。

3. 请对比细胞骨架染色，线粒体超活染色，液泡超活染色，三个实验在染色原理层面的区别。请深深的思考，写出最深刻的理解，谢谢。

【本课小结】

超活染色利用的是实验对象的生物活性发生的显色技术，每种超活染色的原理各不相同，在实际应用时，一定要读懂原理，合理利用染色方法。

【课后作业】

1. 绘制线粒体和液泡的形态图，并描述其分布及形态，并对结果进行分析总结。

2. 将实验结果拍照上传至网络平台。

教学反思

1. 注意鼓励学生自己动手设计实验，通过增加实验材料及实验设计，提高学生的创新思维能力和意识，并通过实验操作实现自己的实验计划。
2. 理解实验原理的前提下，拓展实验操作层次，将基础实验应用到复杂的实验设计中。

实验五 植物细胞骨架的光学显微镜观察

实验目的	(1) 掌握植物细胞骨架标本的基本制备方法； (2) 掌握考马斯亮蓝 R250 对细胞骨架的染色方法； (3) 理解细胞骨架标本制作方法的设计原理；
学习重点	(1) 理解植物细胞骨架标本的制作原理； (2) 理解每级试剂设置在本实验系统内的作用；
学习难点	(1) 理解细胞骨架染色操作关键因素对实验结果的影响，科学分析实验结果。
学时分配	4 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[植物细胞骨架的光学显微镜观察] --> B[细胞骨架基本知识] A --> C[染色与观察] B --> D[成分] B --> E[分布] B --> F[功能] C --> G[曲拉通作用原理] C --> H[考马斯亮蓝染色原理] H --> I[洋葱表皮细胞骨架的观察] </pre>

授课题目	实验五 植物细胞骨架的光学显微镜观察	授课序次	NO.5
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1.学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第五节 细胞骨架标本的光学显微镜观察》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，北京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《植物细胞骨架的染色》实验视频；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 如果洋葱表皮不经任何处理，直接采用考马斯亮蓝染色，会出现什么样的观察效果？</p> <p>(2) 本试验为什么选用考马斯亮蓝对细胞骨架染色？</p> <p>(3) 考马斯亮蓝是如何达到对细胞骨架的“特异性”染色的？提醒：“特异性”是指只有细胞骨架被染成了蓝色。</p> <p>(4) 曲拉通在抽提蛋白质的时候，为什么将细胞骨架“特异性”的留下了，是认识细胞骨架所以手下留情了么？请写出原因。</p> <p>(5) 如果实验结果中观察不到任何细胞骨架的影踪，请分析可能的原因。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>狭义的细胞骨架（cytoskeleton）概念是指真核细胞中的蛋白纤维网络结构。它所组成的结构体系称为“细胞骨架系统”，与细胞内的遗传系统、生物膜系统、并称“细胞内的三大系统”。它通常也被认为是广义上细胞器的一种。广义的细胞骨架概念是在细胞核中存在的核骨架-核纤层体系。核骨架、核纤层与中间纤维在结构上相互连接，贯穿于细胞核和细胞质的网架体系。</p>			

依据理论课的学习，针对细胞骨架这个实验对象，我们需要回答以下问题：细胞骨架分布？细胞骨架形态？细胞骨架的成分？细胞骨架有什么功能？

细胞骨架（cytoskeleton）是指真核细胞中的蛋白纤维网络结构。

真核细胞借以维持其基本形态的重要结构，细胞骨架不仅在维持细胞形态，承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用，而且还参与许多重要的生命活动，如：在细胞分裂中细胞骨架牵引染色体分离，在细胞物质运输中，各类小泡和细胞器可沿着细胞骨架定向转运；在肌肉细胞中，细胞骨架和它的结合蛋白组成动力系统；在白细胞(白血球)的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等方面都与细胞骨架有关。另外，在植物细胞中细胞骨架指导细胞壁的合成。

那么基于以上信息，我们可以细胞骨架的哪些特点完成本次实验任务？

【探究新知】

一、实验目的

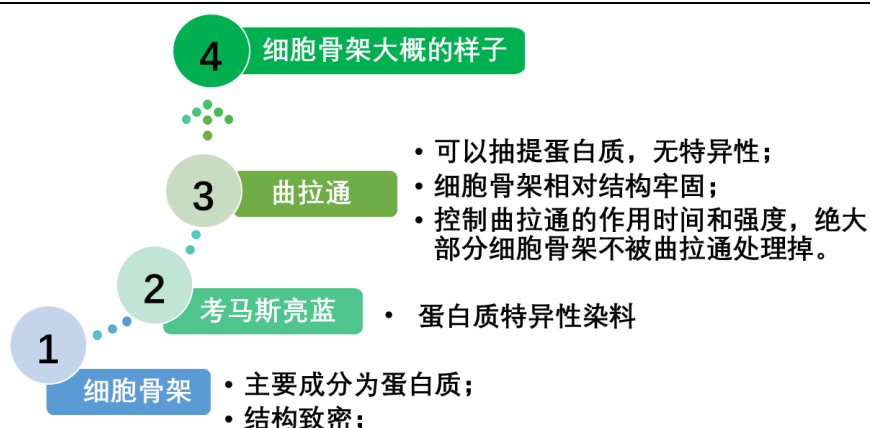
1. 掌握细胞骨架标本的制备方法；
2. 掌握考马斯亮蓝 R250 对细胞骨架的染色方法；
3. 理解细胞骨架标本制作方法的设计原理；

二、实验原理

考马斯亮蓝 R250 可以对各种蛋白质进行染色。 本实验采用去垢剂 Triton-100 的缓冲液处理植物材料，可将细胞的膜结构和大部分蛋白质抽提掉，但细胞骨架系统的蛋白却被保存下来。用考马斯亮蓝 R250 染色，酸性溶液中与蛋白质结合显蓝色，胞质背景着色弱利于细胞骨架纤维显示。在光学显微镜下可见一种网状结构。

常用的细胞骨架的观察方法有：考马斯亮蓝 R250 染色法、荧光素标记的鬼笔环肽染色法、间接免疫荧光法等。

实验原理的剖析：



三、仪器设备及试剂

1. 材料：洋葱表皮，口腔上皮

2. 器材：显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、滴管、擦镜纸、50ml 烧杯

3. 试剂：

pH6.8 的磷酸缓冲液。

M-缓冲液：50mmolL⁻¹ (PH 6.7)咪唑、50 mmolL⁻¹ KCl、0.5 mmolL⁻¹ MgCl₂、1 mmolL⁻¹ EGTA、0.1 mmolL⁻¹ EDTA、1 mmolL⁻¹ 巯基乙醇、4 mmolL⁻¹ 甘油、1 mmolL⁻¹ HCl 调 pH 至 7.2。

1%Triton-X100：用 M-缓冲液配制。

3%戊二醛：用 pH6.8 的磷酸缓冲液配制。

0.2%考马斯亮蓝 R250 染液：0.8g 考马斯亮蓝 R250、46.5ml 甲醇、7ml 冰醋酸、46.5ml 蒸馏水。

四、实验步骤

(1) 撕取洋葱鳞茎内表皮 1cm² 若干片，置于小烧杯中。

(2) 用磷酸缓冲液 (Ph6.8) 提前浸泡 2h 左右。

(3) 吸去磷酸缓冲液，用 1% TritonX-100 处理 20min。抽提细胞骨架以外的蛋白质，从而使骨架图像更加清晰。

(4) 吸去 TritonX-100，用 M—缓冲液洗 2 次，每次 10min。M—缓冲液有稳定细胞骨架的作用。

(5) 用 3%戊二醛固定 0.5~1h。

(6) 用磷酸缓冲液 (Ph6.8) 洗 2 次，每次 10min。

(7) 考马斯亮蓝 R250 染色 30min。

<p>(8) 蒸馏水洗 2 次。</p> <p>(9) 置于载玻片上，盖上盖玻片，在光学显微镜下观察。</p> <p>注意事项：试剂安全（挥发性，接触性），注意处理时间及摇晃程度。</p> <p>【讨论提问】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 如果观察不到细胞骨架，只能看见蓝色细胞核，分析原因。 2. 对实验结果的分析，所观察到的细胞骨架是胞质骨架中的哪种类型，为什么？ <p>【本课小结】</p> <p>细胞骨架里的每级试剂都是根据其功能环环相扣而设置的，所以我们是从小骨架的生物信息（成分和结构特征）为出发点，开展的实验设计，实验步骤是实验原理的实现，进而达到实验目的，实验虽小，但是特别适合学生科研思维的锻炼。</p> <p>【课后作业】</p> <p>(1) 10 倍或 40 倍镜视野下，进行植物细胞骨架生物绘图，并对实验结果进行分析总结。</p>	
教学反思	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 逐步培养学生从实验原理入手理解实验操作的习惯，深刻理解实验原理在整个实验设计中的重要性。 2. 麻雀虽小，五脏俱全的验证型实验，特别适合学生科研思维和自主探究习惯的形成，在将课堂还给学生的前提下，注意引领课堂的学习过程，针对学生明显的知识盲区要注意重点讲解，不能放羊。 	

实验六 植物原生质体的分离与诱导融合

实验目的	<p>专业知识：</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 掌握植物原生质体诱导融合的原理； ② 了解细胞融合技术的商业化应用，如单克隆抗体的制备，嵌合动物等； <p>操作技能：</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 熟练操作酶解法获得植物原生质体； ② 能够独立设计实验，诱导不同植物的原生质体融合； <p>综合素养：</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 通过实验原理的解析，提升获取和处理信息、表达和归纳总结能力； ② 培养独立思考和主动学习的习惯； ③ 针对细胞融合技术的前沿应用，客观对待科学与伦理之间的碰撞；
学习重点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 酶解法获得植物原生质体； 2. 利用 PEG 诱导植物原生质体融合；
学习难点	获得活性较高的植物原生质体，提高诱导融合比率；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上”+“线下”混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[植物原生质体的分离与诱导融合] --> B[植物细胞的分离] A --> C[植物原生质体的分离] A --> D[细胞融合] B --> B1[机械法] B --> B2[酶解法] B2 --> B2_1[果胶酶] C --> C1[机械法] C --> C2[酶解法] C2 --> C2_1[纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶] D --> D1[原理] D --> D2[方法] D --> D3[过程] D1 --> D1_1[细胞膜的流动性] D2 --> D2_1[电融合、病毒诱导、PEG诱导] D3 --> D3_1[诱导植物原生质体融合] </pre>

授课题目	实验六 植物原生质体的分离与诱导融合	授课序次	NO.6
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1.学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第三节 植物原生质体的分离与诱导融合》</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》</p> <p>(3) 视频资源：《电融合》实验视频</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 什么叫细胞融合？</p> <p>(2) 如何获得植物（动物）的单个细胞？</p> <p>(3) 植物细胞细胞壁成分，如何去除植物细胞壁？</p> <p>(4) 细胞（原生质体）可以彼此融合，缘于细胞膜的哪种特质？</p> <p>(5) 细胞融合的基本方法？（拓展学习原理）。</p> <p>如果使用细胞 A 与细胞 B 融合，实验结果中会获得多少种融合细胞。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课程导入】</p> <p>【案例 1】</p> <p>如果自己的两个手指被强力的胶水粘住了，请问如何在无损伤皮肤的状态下，解开两个手指？</p> <p>【案例 2】</p>			

精子和卵子相遇变成受精卵的过程，是像子弹一样射击进去的？钻进去的？



图1 人精子和卵子相遇的瞬间

问题导入

诱导植物原生质体融合的过程，分解成两个核心问题：

- ① 如何将植物原生质体从植物体内分解出来？
- ② 如何让两个原生质体像精卵融合一样，变成一个个体？

【探究新知】

一、实验原理

1. 细胞融合 (cell fusion): 在诱导剂的作用下，两个或两个以上的同源或异源的细胞相互接触，从而发生膜融合、胞质融合和核融合并形成杂种细胞的现象。

- ① 天然发生：如精卵融合；
- ② 人工诱导：聚乙二醇诱导的细胞融合；
- ③ 商业应用：单克隆抗体的制备（新冠疫苗），杂交动物（人兽嵌合动物）；

2. 细胞发生融合源于细胞膜的流动性

动物细胞：可以直接诱导融合；

植物细胞：需要去除细胞壁获得植物原生质体，方能诱导融合；

3. 酶解法获得植物原生质体



【拓展知识】

- ① 获得单个植物细胞的方法：酶解法、机械法；
- ② 获得单个动物细胞的方法：酶解法、机械法，组织块法；

伤口愈合与组织块法：

- ① 切口位置的细胞丧失接触抑制，恢复分裂能力；
- ② 身体的伤口，因为新分裂的细胞逐渐愈合；
- ③ 瓶子里分裂的细胞贴壁生长，获得单个细胞；



图 2 瘢痕组织和组织块培养法

二、实验器械与试剂

低速离心机、显微镜、恒温水浴锅、300 目铜网、离心管、小烧杯、剪刀
PBS、13% W/V 的甘露醇、果胶酶、纤维素酶与甘露醇混合液、诱导融合剂 PEG

三、实验步骤

1. 酶解法获得植物原生质体

- (1) 将撕去表皮的植物叶片剪碎，室温酶解 0.5h；
- (2) 用 300 目铜网过滤，除去未完全消化的叶片等残渣；
- (3) 1000rpm, 离心 5min，弃上清液；
- (4) 3-4ml 甘露醇洗液，清洗两次；

2. PEG 诱导植物原生质体融合

- (1) 原生质体与 PEG 液 2: 1 体积比混匀，37℃水浴中温浴 10min；
- (2) 融合液一滴于载玻片上，轻轻盖上盖玻片，显微镜观察；
- (3) 隔两 min，在盖玻片一端缓慢滴加甘露醇清洗液，另一端用吸水纸吸取液体，观察融合过程；

3. 观察时注意不同程度的融合现象

①两细胞膜接触，粘连；②细胞膜形成穿孔；③两细胞的细胞质连通；④通道扩大，两细胞连成一体；⑤细胞完全合并，形成一个含有两个或多个核的圆形细胞。

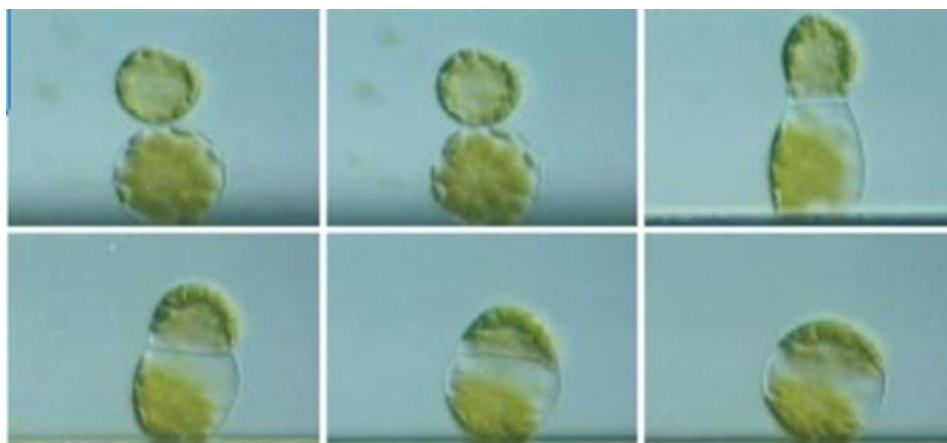


图3 植物原生质体发生融合的生物学过程

【讨论提问】

- (1) 如果离心需要配平，配平的液体应该为本系统内的什么溶液？
- (2) 如果人的细胞和羊的细胞诱导了融合，能不能接受？你的观点？
- (3) 今天的实验内容，是真正意义的细胞融合（原生质体融合）么？

【本课小结】

- (1) 细胞融合缘于细胞膜具有流动性；
- (2) 利用工具酶可以获得单个的动物细胞（植物原生质体）；
- (3) 细胞融合技术具有广泛的商业应用，迅猛的科学进展，要以端正的科学观对待和理解。

【课后作业】

- (1) 10 倍或 40 倍镜视野下，植物原生质体诱导融合过程生物绘图，对实验结果进行分析总结。
- (2) 文献调研了解细胞融合技术的前沿应用进展；

教学反思

1. 鉴于实验室条件限制，本实验不能采用无菌条件进行操作，所以授课过程中一定要强调细胞融合技术的操作标准和结果验证，避免学生产生认知误差。
2. 线上教学的导学作业需要更加提炼和深刻，保障其引导学生思考探究的功能，教师需要具有敏锐的观察能力，及时掌握学生认知的发展个体差异性和知识盲区，对课堂教学策略和教学设计进行调整，保证线上和线下教学的有效衔接。
3. 需要进一步转变课堂主导者的身份，依靠学生引领课堂的发展节奏，其中的教学技巧还有待进一步磨练成熟。

实验七 动物细胞培养的无菌化准备

教学目标	(1) 掌握无菌室无菌化准备流程及方法； (2) 掌握动物细胞培养各类仪器器皿的无菌化处理方法及标准；
学习重点	(1) 各种操作对象的无菌化标准及方法；
学习难点	(1) 形成较为系统的无菌操作意识，并认识到无菌操作的严谨性；
学时分配	8 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[无菌操作的准备] --> B[房间] A --> C[设备] A --> D[器皿] A --> E[试剂] B --> B1[地面、空气] B1 --> B2[紫外；甲酚皂] C --> C1["CO2恒温培养箱、超净工作台、倒置显微镜、离心机"] C1 --> C2[紫外、新洁儿灭] D --> D1["离心管、培养瓶、培养基瓶、解剖器械等"] D1 --> D2[清洗、包装、湿灭] E --> E1["培养液、胰蛋白酶、血清、双抗等"] E1 --> E2[无菌、分装、低温储存] </pre>

授课题目	实验七 动物细胞培养的无菌化准备	授课序次	NO.7-8
总学时数	8 学时	授课时长	2 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第七节 动物细胞培养的无菌化准备》</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》</p> <p>(3) 视频资源：《动物细胞培养实验室的准备》实验视频</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 什么叫无菌？如何判定？</p> <p>(2) 紫外照射适用于哪些物品的无菌化？</p> <p>(3) 大型仪器怎样无菌化？</p> <p>(4) PBS 如果染菌了，可以采用哪些方法无菌化？</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课堂导入】</p> <p><u>动物细胞在动物体内生长的时候，是否处于无菌的环境？</u></p> <p><u>如果细胞生长环境有细菌的生长，会发生什么状况？</u></p> <p>无菌操作技术是细胞工程相关技术操作中的重要实验条件，只有在无菌的条件下，才能正确的模拟动物细胞、组织、器官等生物学材料正常生长、发育、改造所需的各种环境。因此，为了顺利的开展细胞工程学相关实验操作，必须保持无菌物品、无菌区域不被污染、防止病原微生物入侵。实验操作人员需要正确、熟练地掌握无菌操作技术，了解无菌操作流程，在技术操作中严守操作规程；以确保实验操作人员的安全，保障实验操作的无菌化和顺利开展，甚至防止医源性感染的发生。</p>			

【探究新知】**一、实验目的**

1. 掌握动物细胞培养及植物组织培养前期无菌化准备的流程；
2. 掌握动物细胞培养及植物组织培养各类无菌化处理方法及标准；

二、实验原理

采用强烈的理化因素使任何物体内外部的微生物永远丧失其生长繁殖能力的措施，称为灭菌。

灭菌常用的方法有化学试剂灭菌、射线灭菌、干热灭菌、湿热灭菌和过滤除菌等。可根据不同的需求，采用不同的方法。灭菌的彻底程度受灭菌时间与灭菌剂强度的制约。微生物对灭菌剂的抵抗力取决于原始存在的群体密度、菌种或环境赋予菌种的抵抗力。

案例

紫外消毒：无活性对象，如地面、空气；

离地面 2 米的 30W 灯可照射 9 平方米房间，照射 20-30min；

高温湿热灭菌：布类、玻璃器皿、金属器皿、胶塞和某些培养用液；

121℃, 30 min 或 115 °C, 20 min；

干温干热灭菌：不怕高温的非活性物品；

保证温度 160℃以上, 保持 90-120min；

过滤除菌：液体，0.22 微米孔径；

新洁尔灭：现用现配，擦拭；

甲酚皂：强氧化剂，地面；

臭 氧：强氧化剂，表面及空气消毒

三、实验器材

玻璃器皿： 移液管、指管、离心管、培养瓶、100ml 玻璃瓶、250ml 玻璃瓶、培养皿、大橡皮塞、培养瓶盖、过滤器。

实验器械： 眼科剪、眼科镊。

仪器： 超净工作台、干燥箱、高压锅、烘箱。

试剂： 75%酒精、1%新洁尔灭、高锰酸钾、重铬酸钾、浓硫酸、RPMI1640、DMEM、NaHCO₃、胰蛋白酶液、D-Hanks 液、100ml 量筒、1000ml 量筒、100ml 烧杯、1000ml 烧杯、小牛血清、双蒸水、三蒸水等。

四、实验步骤

(一) 清洗**1. 玻璃器皿的清洗**

一般玻璃器皿清洗的程序包括：浸泡、刷洗、浸酸和冲洗四个步骤。

组织细胞培养中，工作量最大的是玻璃器皿的清洗。清洗后的玻璃器皿不仅要求透明、无污迹，而且不能残留任何物质。某些化学物质仅残留百万分之一毫克，就会对细胞产生毒性作用。因此清洗质量的好坏直接影响到细胞培养成功与否，必须严格按照清洗的程序进行，以保证达到清洗的目的。

(1) 浸泡

初次使用和培养用后的玻璃器皿都需先用清水浸泡，以使附着物软化或溶解，培养后的玻璃器皿往往粘有大量蛋白质，干燥后不易刷洗掉，故用后立即浸入清水中，注意让水完全进入瓶皿中，不应留有气泡。

新的玻璃器皿表面常附着灰尘，同时在生产过程中，玻璃表面常呈碱性并带有一些对细胞有毒的物质，如铅和砷等。新瓶皿使用前应先用自来水简单刷洗，然后用稀盐酸溶液（5%）浸泡过夜，以中和其中的碱性物质。

(2) 刷洗

浸泡后的玻璃器皿一般仍然要用毛刷沾洗涤剂洗涤，以去除器皿表面附着较牢的杂质。刷洗玻璃器皿易用软毛刷和优质洗涤剂（如高级洗衣粉和洗洁精），绝对不能使用含沙粒的去污粉，注意特别要刷洗瓶角部位。

(3) 浸酸

刷洗不掉的微量杂质经过浓硫酸和重铬酸钾清洁液的强氧化作用后，可被除掉，而且对玻璃器皿无腐蚀作用，去污能力很强，是清洗过程中关键的一环。清洁液是由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水按一定比例配制而成。浸泡时，器皿要充满清洁液，勿留气泡。浸泡时间不应少于 6h，一般应浸泡过夜。

清洁液一般可配制三种强度，配方如下：

【强 液】

重铬酸钾	63g
浓硫酸	1000ml
蒸馏水	200ml

【次强液】

重铬酸钾	120g
浓硫酸	200ml
蒸馏水	1000ml
【弱 液】	
重铬酸钾	100g
浓硫酸	100ml
蒸馏水	1000ml
(4) 冲洗	
<p>刷洗和浸酸后都必须用水充分冲洗，使之不留任何残迹。冲洗宜用洗涤装置，以保证冲洗效果，省时省力，亦可用手工操作，但每瓶都得用水灌满，倒掉，重复十五次以上，最后再用蒸馏水漂洗 2~3 次，凉干备用。</p>	
2. 橡胶制品的清洗	
(1) 组织细胞培养中所用橡胶制品主要是橡胶塞、圈以及滴管头等。	
(2) 新购置的橡胶制品带有大量滑石粉应先用自来水冲洗干净后，再作常规清洗处理。	
(3) 常规处理方法是：每次使用后的橡胶制品都要置入水中浸泡，以便集中处理和避免附着物干涸，然后用 2%NaOH 液煮沸 10~20min，以除掉培养中的蛋白质。自来水冲洗后，再用 1%稀盐酸浸泡 30min，最后用自来水和蒸馏水各冲洗 2~3 次，凉干备用。	
3. 塑料制品的清洗	
(1) 用流水冲洗干净，残留有附着物可用脱脂棉轻轻擦拭，晾干；	
(2) 用 2%NaOH 液浸泡过夜，用自来水充分冲洗；	
(3) 用 5%盐酸溶液浸泡 30min，随后用自来水冲洗干净，再用蒸馏水漂洗 5~6 次，晾干后备用。	
4. 金属器具的清洗	
<p>组织细胞培养所用金属器具主要是一些手术刀、剪、镊子、针等，这些器具使用后应立即用酒精擦洗干净，晾干后备用。</p>	
(二) 包装	
<p><u>(1) 包装的目的是防止器皿器具消毒灭菌后再次遭受污染，所以这些培</u></p>	

养用品在消毒处理前要经严格的包装。

(2) 清洗后的器皿可先放入鼓风干燥箱中烘干，或置于通风无尘处自然晾干，然后包装起来，再做消毒处理。包装后的器皿应便于消毒和储存。

(3) 包装材料常用不印字的皱纹纸、牛皮纸、硫酸纸、脱脂棉、棉布和鞋底线等，包装后的培养用品装入铝饭盒或不锈钢饭盒及金属制的消毒筒内。

(4) 较大的瓶皿、滤器、消毒筒等只需把瓶口部分用硫酸纸包裹后，再罩以牛皮纸或棉布密包起来用鞋底线扎紧即可。

(5) 比较小的培养皿、注射器、金属器具和橡胶塞等，需采用全包装，即用牛皮纸全部包起来后装入金属盒或筒，盖上盖子再用牛皮纸包扎起来。用笔写上盒内所装物品的名称、数量、日期等。

(6) 移液管包装时要用脱脂棉将接头处堵塞，松紧适宜，然后装入筒中，筒底要垫软纸或棉花以防移液管装入时折断管尖。最后将筒口用纸包起用线扎紧即可。

(三) 器皿器具及环境的消毒

对组织细胞培养实验最危险的是发生包括细菌、真菌和病毒等微生物的污染。它们都能直接影响实验结果。污染主要是由于操作者的疏忽而引起的，如操作台表面或周围空气不洁、培养器皿器具和培养液消毒灭菌不彻底或存放过久等。因而，组织细胞培养的每个环节都应采取严格的消毒措施，以防止发生污染。消毒方法分为三类：即物理消毒法、化学消毒法和抗生素抑菌法。

1. 物理消毒法

1.1 湿热消毒

即高压蒸汽消毒，实验室一般采用手提式高压灭菌锅消毒，是最有效的方法之一。适合于玻璃器皿、金属器具、橡胶制品、布质类以及耐热的无机离子平衡液等的消毒。

(1) 将消毒锅洗净，放入适量的水（水面必须盖过电热管，以防电热管干裂!）。

(2) 将所需消毒的物品放入消毒锅，消毒物品不能装的太满，以保证消毒器内气体的流通，消毒瓶装液体时，橡皮塞与瓶口之间要加一根通气线，防止瓶内气体受压将瓶塞蹦出。

(3) 加上消毒锅盖，拧紧螺栓防止漏气。在加热升压之前，先要打开排气阀门，排出残留在锅内的冷空气，因此，导气管一定要插到锅底并不能堵塞。

(4) 关闭排气阀门，继而开始升压，当达到所需的压力时，通过调节火力大小，使压力稳定在所需数值后开始计算时间。

(5) 灭菌后不要立即打开气阀放气以免水气喷出。要让其自然降温降压至 0 磅，才能打开气阀。各种物品有效消毒压力和时间不同，一般要求如下：

培养用液、橡胶制品	8 磅 30min
布类、玻璃器皿、金属器具等	15 磅 20min

1.2 干热消毒

实验室一般采用干燥箱进行，适用于玻璃器皿的干燥消毒，由于干热传导慢，因此需要升温到 160℃和保持 90~120min，才能杀死细菌芽孢，达到消毒目的。消毒后不要立即打开箱门，以防冷空气骤然进入引起玻璃炸裂，影响消毒效果。

1.3 过滤消毒

大多数培养用液，如人工合成培养液、血清、酶溶液等，在高温下会发生变性，失去其生物学功能，必须采用过滤法除菌。微孔滤膜，质地均匀，有 0.60um、0.45um 和 0.22um 等几种规格，常用孔径 0.22um 滤膜过滤一般培养用液而除菌。

1.4 紫外线消毒

紫外线直接法很方便，效果好，是实验室常用的消毒法，适用于消毒空气、操作台表面和一些不能使用其它方法进行消毒的培养器具（如少量的塑料培养皿、培养板等）培养室的紫外线灯应距地面 2.5 米，使得每平方厘米有 0.06 微瓦能量的照射，才能发生有效的消毒作用。消毒时物品要相互分开，避免遮挡紫外线的照射。

注意：由于紫外线照射时会产生臭氧以及对细胞、培养液、包括人体都有一定的损伤作用，因此不要一边照射一边操作，以免受伤。照射 30min，可达灭菌效果。

1.5 熏蒸消毒

当遇到细胞培养出现多次污染，或实验室两个月一次的常规消毒，均可以用高锰酸钾 5-7.5g，加甲醛（40%）10-15mL，混合放入一开放容器内，立即可见白色甲醛烟雾，消毒房间需封闭 24h，至少 4h 以上。

1.6 煮沸消毒

它的优点是简便迅速，缺点是湿度大，消毒后物品不适于长时间保存，这种方法适宜于临时需要消毒的耐热物品，如金属器具和注射器等在水中煮沸 20~30min，趁热倒去水分即可使用。但金属器具煮沸后宜马上使用，以防器具生锈。

2. 化学消毒法

化学消毒剂，包括新洁尔灭、来苏儿、过氧乙酸和酒精等。主要适用于那些无法用其它方法消毒的物品，如操作者的皮肤、操作台面及无菌室内的桌椅、墙壁和空气等（可于紫外线配合消毒，互相取长补短）。实验室最常用的化学消毒剂是 0.1%新洁尔灭和 70%的酒精，这些消毒剂对皮肤和细胞毒性小，尤其对那些瓶皿开口部位的消毒，效果很好。过氧乙酸是新近推出的一种消毒剂，消毒能力极强，在 0.5%浓度，10min 即可将芽孢杀灭，可以用作各种物品的表面消毒，使用时需用水稀释后用喷洒和擦拭的方法消毒。

3. 抗生素消毒法

抗生素消毒作用主要是抑制液体内的细菌繁殖，因此适用于细胞培养用液的消毒，延长培养用液的有效期。抗生素种类很多，实验室常用的是青、链霉素混合液也称“双抗”液，其抑菌效果很好。

（四）试剂配置

1. D-Hanks 液配制

D-Hanks 原液

NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.06g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
蒸馏水	100ml

配制时，按配方顺序逐一用水彻底溶解，必须在前一药品完全溶解之后，

才能加入下一种药品，原液暂时不用可置 4℃冰箱保存。

D-Hanks 使用液

D-Hanks 原液 10ml

蒸馏水 90ml

加 5%NaHCO₃，调整 PH 值至 7.2。

将配好的 D-Hanks 使用液，分装，包扎瓶口，经 8 磅 30min 或 10 磅 15min 灭菌后，置 4℃冰箱备用。使用前加双抗于 D-Hanks 使用液中浓度为 1%。

2. 0.25%胰蛋白酶液配制

胰蛋白酶 0.25g

D- Hanks 使用液 100ml

先用少量 D-Hanks 液把胰蛋白酶粉末调成糊状，再加 D-Hanks 液溶解，用 5%NaHCO₃ 调 pH 至 7.6~7.8，用 D-Hanks 液定容至 100ml。过滤除菌，分装小瓶，置冰箱中-18℃冰冻保存。

3. RPMI1640、DMEM 培养基配制

90ml 分装后，加双抗于培养液中浓度为 1%。使用时加 10%小牛血清。

4.小牛血清的处理

10ml 分装，使用前应做热灭活处理，即通过加热的方法破坏补体。将小牛血清放入 56℃水浴中 30min，其间要不时轻轻晃动，使受热均匀，防止沉淀析出。

5.双抗溶液配制

青霉素 1 瓶（80 万单位）加 4ml 灭菌的 D-Hanks 液，即成 20 万单位/ml 溶液。

链霉素 1 瓶（100 万单位）加 5ml 灭菌的 D-Hanks 液，即成 20 万单位/ml 溶液。

取 1 和 2 溶液各 0.5ml 混合，加入 9ml 灭菌的 D-Hanks 液，则成含青、链霉素各 1 万单位/ml，分装后置 4℃冰箱保存备用。

【讨论提问】

1. 无菌操作准备的时候，你会按照哪个逻辑顺序开展工作？

<p>2. 如果一样物品功能不明，你会根据哪些特征判定其无菌化方法？</p> <p>【本课小结】</p> <p>无菌化工作是个系统连贯的操作，环环相扣，不能疏忽大意的准备工作，同学需要通过自己亲自筹备无菌操作的准备工作，形成端正的无菌操作理念和意识。</p> <p>【课后作业】</p> <p>1. 记录无菌化准备的基本流程，形成可行性技术路线图。</p>	
教学反思	
<p>1. 从本实验开始注意引导学生的自主性，给出实验计划，由学生自主设计实验流程，完成整个实验准备工作，注意调动学生的参与意识，“为自己准备实验”，不仅要有责任心，又要对整个实验具有完整的掌控。</p> <p>2. 注意教师的引领和规范，学生在准备实验得时候，场面容易失控，一定要其实注意教学秩序的走向。</p>	

实验八 动物细胞传代培养的虚拟仿真实训

教学目标	(1) 通过虚拟实验室，对动物贴壁细胞的培养过程形成感性认知； (2) 完成动物贴壁细胞传代培养的实训操作；
学习重点	(1) 独立完成贴壁细胞的传代培养操作；
学习难点	(1) 动物细胞培养无菌操作理念的形成；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上”+“线下”混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[贴壁细胞的传代培养] --> B[概念] A --> C[传代培养] B --> D[传代培养] B --> E[原代培养] D --> F[基本方法] E --> F C --> G[操作流程] C --> H[细胞生长曲线] C --> I[染菌判断方法] </pre>

授课题目	实验八 动物细胞传代培养的虚拟仿真实训	授课序次	NO.9
总学时数	8 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第八节 动物贴壁细胞的传代培养》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《细胞的传代培养》实验视频；</p> <p>(4) 沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 细胞依靠什么机制贴附在培养瓶壁上的？</p> <p>(2) 贴壁的细胞和非贴壁的细胞形态上有什么区别？</p> <p>(3) 所谓的“消化细胞”是什么意思，胃消化食物么？</p> <p>(4) 如何判断细胞已经不在贴壁状态？</p> <p>(5) 利用《沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台》了解动物贴壁细胞的传代过程。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课堂导入】</p> <p><u>养细胞和养宠物是一样的，需要观察在哪生长舒服，细胞饿没饿？细胞生没生病？房间住着挤不挤？这是一个细胞培养员应该具备的基本能力和素养。</u></p> <p>传代培养实验是几乎所有细胞生物学实验的基础。当原代培养成功以后，随着培养时间的延长和细胞不断分裂，细胞之间相互接触而发生接触性抑制，生长速度减慢甚至停止；另一方面也会因营养物不足和代谢物积累而不利于生长或发生中毒。此时就需要将培养物分割成小的部分，重新接种到另外的培养器皿（瓶）内，再进行培养。</p> <p><u>那么，如何让贴壁的细胞搬家呢？</u></p>			

【探究新知】**一、实验目的**

1. 掌握动物贴壁细胞传代培养的基本操作过程；
2. 学习观察体外培养细胞的形态及生长状态；
3. 熟练无菌操作技术。

二、实验原理

细胞由原培养器皿分离稀释后传到新的培养器皿的过程称为传代（passage）或者传代培养（subculture）。工具酶为 0.25% 胰蛋白酶。

传代的原因：

（1）细胞生长和增殖单层细胞将铺满培养瓶底，或密度过大，产生了接触抑制；

（2）单个细胞克隆过于密集，需要传代疏散细胞；

对于贴壁细胞培养而言，80% 汇合或刚汇合的细胞是较理想的传代阶段。

体外培养的原代细胞或细胞株要在体外持续地培养就必须传代，以便获得稳定的细胞株或得到大量的同种细胞，进行下一步的实验并维持细胞种的延续。传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞的数量和细胞增殖速度有关。

三、实验器材

超净工作台，二氧化碳培养箱，倒置显微镜，酒精灯、吸管、培养瓶、离心管、离心机、血球计数板。

Hanks 液、75% 酒精、0.25% 胰蛋白酶、DMEM 培养液（含小牛血清及青、链霉素）；

人肺癌细胞 A549 或其它贴壁细胞；

四、实验步骤

1. 虚拟实验室演示与操作

基于《沈阳师范大学生命科学学院细胞培养虚拟培训平台》，学生演练。

2. 个人操作标准化

根据实验原理，个人熟悉操作步骤，无菌室外强化标准操作；

【讨论提问】

1. 无菌操作的关键？

2. 细胞传代培养的操作内在逻辑。

【本课小结】

传代培养是基于无菌操作的基础之上，开展的第一次细胞培养操作模拟，过程中不仅要注意无菌操作的标准，更要严格遵守传代培养的技术要领，我们培养的是“活的”、“软软的”细胞。

【课后作业】

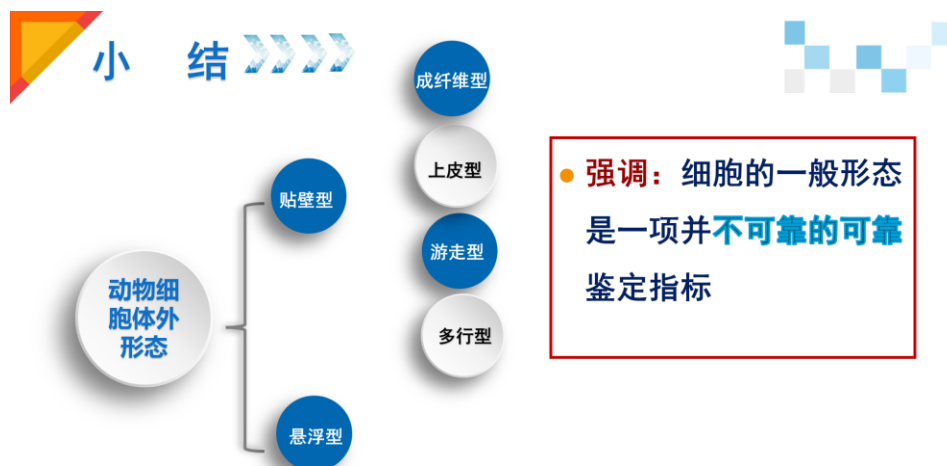
1. 记录传代培养的操作心得和体会；

【拓展资料】

1. 细胞生长环境（二氧化碳培养箱的设置）：

- (1) 恒温动物：37 °C ± 0.5 °C ，耐寒；
- (2) PH: 7.2-7.4；耐酸
- (3) 5%CO₂（二氧化碳含量 2-10% ）
- (4) 无菌
- (5) 保持一定湿度（饱和）

2. 动物细胞体外生长的形态：



3. 所谓细胞“一代”，即从细胞接种到分离再培养的一段时间（细胞由原培养瓶内分离稀释后传到新的培养瓶的过程称为传代，进行一次分离再培养称之为传一代），如某一细胞系为 50 代即该细胞已传代 50 次。

其中贴壁型细胞是需要附着在某一固相支持物表面才能生长的细胞，贴壁铺展，有丝分裂形成致密的细胞单层，又叫做单层细胞培养，一般采用酶消化法进行传代。半悬浮生长细胞则部分呈现贴壁生长现象，贴壁不牢，可用直接吹打法使细胞从瓶壁脱落下来，进行传代。悬浮型细胞为不必附着于固相支持物表面，在悬浮状态下即可生长的细胞，一般采用离心法进行传代。

<h3>教学反思</h3>	
<ol style="list-style-type: none">1. 学生第一次独立完成无菌操作，而且是一个比较复杂的实验，要给予学生足够的准备空间。2. 实际操作的时候，注意规范动作，但是不能催促学生，保证学生的操作空间，建议下次实验的时候，由学生助手全程录像，方便学生实验反思和改进。3. 督促学生课下及时关注自己的实验结果，细胞实验不能下课就结课，细胞是活的实验对象，需要做好长期实验的准备。	

实验九 动物贴壁细胞的复苏

教学目标	(1) 掌握细胞复苏的基本原理； (2) 熟练进行细胞复苏的操作；
学习重点	(1) 自主完成贴壁细胞的复苏操作；
学习难点	(1) 基于标准的无菌操作，保证复苏细胞的存活率；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR Root[贴壁细胞的冻存与复苏] --> Freezing[细胞冻存] Root --> Thawing[细胞复苏] Freezing --> Freezing_Concept[概念] Freezing --> Freezing_Principle[原则] Freezing --> Freezing_Flow[操作流程] Thawing --> Thawing_Concept[概念] Thawing --> Thawing_Principle[原则] Thawing --> Thawing_Flow[操作流程] Freezing_Principle --- Box1["1. 冷冻保护剂；
2. 缓慢冻存；
3. -196℃ 保存"] Thawing_Principle --- Box2["1. 快速复温；
2. 快速去除二甲亚砜；"] </pre>

授课题目	实验九 动物贴壁细胞的复苏	授课序次	NO.10
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第九节 动物贴壁细胞的复苏》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《动物细胞冻存与复苏》实验视频；</p> <p>(4) 沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 类比东北冬天的冻梨，如果直接将细胞冷冻会出现什么样的效果？</p> <p>(2) 你如何看待人体冷冻技术？如果将来科技足够发达，你会选择该项服务么？</p> <p>(3) 目前活体冻存与复苏技术的最大缺陷，你认为是什么？</p> <p>(4) 冷冻保护剂在细胞冻存中的作用是什么？</p> <p>(5) 利用《沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台》了解动物贴壁细胞的冻存与复苏过程。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课堂导入】</p> <p>【案例】</p> <p>杜虹是重庆知名儿童文学作家，2015 年 5 月 30 日因胰腺癌去世。在去世之前，杜虹以及家人，辗转联系到了一个专门从事人体冰冻研究的科研机构——美国阿尔科生命延续基金会(英文名称 Alcor)。该基金会是目前世界上最大的人体冷冻机构之一。杜虹一家选择了花费 12 万美金(约 75 万元人民币)大脑冷冻。按 Alcor 科学家的乐观估计，50 年后的科学技术也许就能让杜虹解冻头部、再造身体，也就是——复活。</p>			

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。细胞一旦离开活体开始原代培养，它的各种生物特性都将逐渐发生变化，并随着传代次数的增加和体外环境条件的变化而不断有新的变化。因此及时进行细胞冻存十分必要。冻存可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。而且适度地保存一定量的细胞，可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种，起到了细胞保种的作用。除此之外，还可以利用细胞冻存的形式来购买、寄赠、交换和运送某些细胞。

那么，在开始动物细胞培养之前，细胞复苏是关键步骤。

【探究新知】

一、实验目的

- (1) 掌握细胞复苏的基本原理；
- (2) 熟练进行细胞复苏的操作；

二、实验原理

复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。也不会暴露在高浓度的电解质溶液中过长的时间，从而无冰晶损伤和溶质损伤产生，冻存的细胞经复苏后仍保持其正常的结构和功能。

三、实验器材

1. 材料：人肺癌细胞 A549；
2. 试剂：DMEM 基本培养液、胎牛血清、胰酶、DMSO，PBS。
3. 仪器：倒置显微镜，二氧化碳培养箱，压蒸汽灭菌锅，超净工作台等。

四、实验步骤

- (1) 从低温冰箱或液氮中取出塑料冻存管。
- (2) 迅速放入 37℃ 水浴中，并不断摇动，使其急速融化，30s~1min 内完成。
- (3) 冻存管用 70%酒精棉球擦拭消毒后，打开上盖，用吸管将细胞悬液吸到离心管中。
- (4) 低速离心（1000r/min）10min，去上清液。后再用培养液洗一次。

<p>(5) 沉淀加 10mL 培养液，吹打均匀后再离心 10min，弃上清液。</p> <p>(6) 加适量培养基后将细胞转移至培养瓶中，置 37℃ 恒温箱中培养，第二天观察细胞生长情况。</p> <p>注意事项：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 保证慢冻快融的原则。 2. 水浴锅内冻存管太多，导致传热不佳，使融化时间延长。 3. 常温下 DMSO 对细胞存在伤害，冻存液需要预降温至 4℃，细胞接触冻存液后要迅速移至低温冰箱内降温。 4. 离心前切记平衡，避免导致离心机损坏和细胞丢失。 5. 一次复苏细胞过多，更换吸头和吸管，避免导致细胞交叉污染。 <p>【讨论提问】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 为什么采用慢冻存慢复苏的原则？ 2. 细胞冻存的数量会不会影响复苏效果？ <p>【本课小结】</p> <p>掌握细胞复苏的技术流程，熟练无菌操作技术。在掌握传代培养的基础上，进行细胞复苏实验验证无菌操作效果和细胞存货情况。</p> <p>【课后作业】</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 拍照记录复苏的细胞状态； (2) 在下次实验，拍照记录细胞贴壁的状态，对冻存效果进行评估； 	
教学反思	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 两个实验相辅相成，自己冻存细胞，自己复苏细胞，经过两次独立的实验操作，本实验应该由学生完全独立完成，最好形成开放实验室的模式，由学生自主决定何时做实验，何时收集结果，形成独立自主的操作习惯。 	

实验十 动物贴壁细胞的传代培养

教学目标	(1) 掌握动物贴壁细胞传代培养的基本操作过程； (2) 观察体外培养细胞的形态及生长状态； (3) 熟练无菌操作技术；
学习重点	(1) 能够独立、标准化的进行动物贴壁细胞的传代；
学习难点	(1) 在传代的过程中注意无菌操作的严格性； (2) 了解细胞需要传代的判定标准；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上”+“线下”混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学+现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[贴壁细胞的传代培养] --> B[概念] A --> C[传代培养] B --> D[传代培养] B --> E[原代培养] D --> F[基本方法] E --> F C --> G[操作流程] C --> H[细胞生长曲线] C --> I[染菌判断方法] </pre>

授课题目	实验十 动物贴壁细胞的传代培养	授课序次	NO.11
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第八节 动物贴壁细胞的传代培养》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《细胞的传代培养》实验视频；</p> <p>(4) 沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 细胞依靠什么机制贴附在培养瓶壁上的？</p> <p>(2) 贴壁的细胞和非贴壁的细胞形态上有什么区别？</p> <p>(3) 所谓的“消化细胞”是什么意思，胃消化食物么？</p> <p>(4) 如何判断细胞已经不在贴壁状态？</p> <p>(5) 利用《沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台》了解动物贴壁细胞的传代过程。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课堂导入】</p> <p><u>养细胞和养宠物是一样的，需要观察在哪生长舒服，细胞饿没饿？细胞生没生病？房间住着挤不挤？这是一个细胞培养员应该具备的基本能力和素养。</u></p> <p>传代培养实验是几乎所有细胞生物学实验的基础。当原代培养成功以后，随着培养时间的延长和细胞不断分裂，细胞之间相互接触而发生接触性抑制，生长速度减慢甚至停止；另一方面也会因营养物不足和代谢物积累而不利于生长或发生中毒。此时就需要将培养物分割成小的部分，重新接种到另外的培养器皿（瓶）内，再进行培养。</p> <p><u>那么，如何让贴壁的细胞搬家呢？</u></p>			

【探究新知】**一、实验目的**

- (1) 掌握动物贴壁细胞传代培养的基本操作过程;
- (2) 观察体外培养细胞的形态及生长状态;
- (3) 熟练无菌操作技术;

二、实验原理

细胞由原培养器皿分离稀释后传到新的培养器皿的过程称为传代 (passage) 或者传代培养 (subculture)。工具酶为 0.25% 胰蛋白酶。

对于贴壁细胞培养而言, 80% 汇合或刚汇合的细胞是较理想的传代阶段。

体外培养的原代细胞或细胞株要在体外持续地培养就必须传代, 以便获得稳定的细胞株或得到大量的同种细胞, 进行下一步的实验并维持细胞种的延续。传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞的数量和细胞增殖速度有关。

三、实验器材

超净工作台, 二氧化碳培养箱, 倒置显微镜, 酒精灯、吸管、培养瓶、离心管、离心机、血球计数板。

Hanks 液、75% 酒精、0.25% 胰蛋白酶、DMEM 培养液 (含小牛血清及青、链霉素);

人肺癌细胞 A549 或其它贴壁细胞;

四、实验步骤

(1) 传代前, 将培养瓶置倒置显微镜下, 观察细胞是否已长成致密单层, 如已长成致密单层, 则可以进行细胞传代。

(2) 倒掉培养细胞的旧培养基。酌情可用 2-3 mL Hanks 液洗去残留的旧培养基, 或用少量胰酶涮洗一下。

(3) 每个大培养瓶加入 1 mL 胰酶, 小瓶用量酌减, 盖好瓶盖后在倒置显微镜下观察, 当细胞收回突起变圆时立即翻转培养瓶, 使细胞脱离胰酶。

(4) 将胰酶倒掉。注意勿使细胞提早脱落入消化液中。

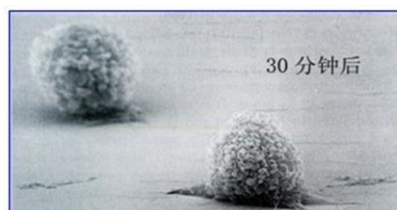
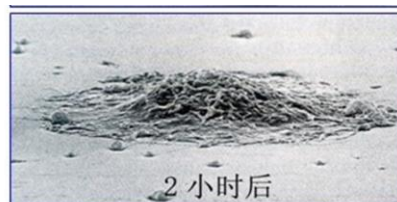
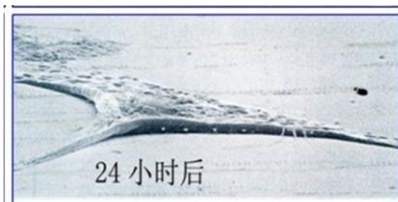
(5) 加入少量的含血清的新鲜培养基, 反复吹打消化好的细胞使其脱壁并分散,

(6) 根据分传瓶数补加一定量的含血清的新鲜培养基(7~10 mL / 大瓶,

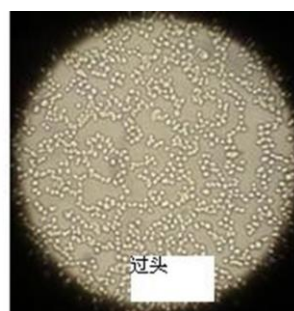
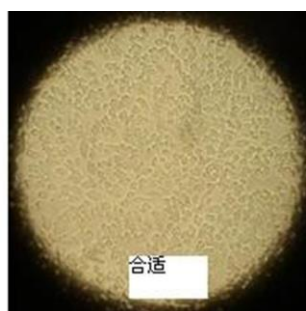
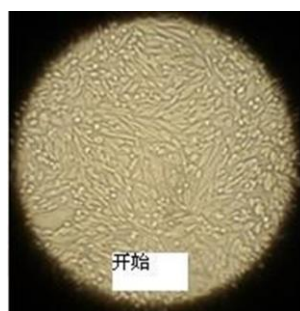
3~5 mL / 小瓶)制成细胞悬液,

(7) 分装到新培养瓶中。盖上瓶盖, 标记细胞名称及操作时间

(8) 适度拧紧后再稍回转, 以利于 CO_2 气体的进入, 将培养瓶放回 CO_2 培养箱。



细胞贴壁和消化的形态改变



注意事项

- (1) 实验之前将实验中用到的培养液及其他溶液先于 37°C 温育一段时间。
- (2) 向培养有细胞的培养瓶中加入液体时, 一般沿着生长细胞的对面瓶壁注入, 然后慢慢转动培养瓶。
- (3) 操作过程中要尽量轻拿轻放。
- (4) 酶解消化过程中要不断观察, 消化过度会对细胞造成损害, 消化不够则难于将细胞解离下来。

【讨论提问】

1. 根据什么标准判断细胞已经长满, 可以传代?
2. 细胞“消化好”的标准是什么?

<p>80%标准</p> <p>3. 吹打至细胞悬液的判定标准是什么？</p> <p>细胞单个呈球形，漂浮于培养液中。</p> <p>【本课小结】</p> <p>传代培养是基于无菌操作的基础之上，开展的第一次细胞培养操作，过程中不仅要注意无菌操作的标准，更要严格遵守传代培养的技术要领，我们培养的是“活的”、“软软的”细胞。</p> <p>【课后作业】</p> <p>(1) 记录独立开展传代培养的操作心得和体会；</p> <p>(2) 拍照记录细胞传代后的形态，通过对比贴壁前后细胞的状态，对细胞的活性和无菌操作情况进行判断；</p>	
教学反思	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 学生第一次独立完成无菌操作，而且是一个比较复杂的实验，要给予学生足够的准备空间。 2. 实际操作的时候，注意规范动作，但是不能催促学生，保证学生的操作空间，建议下次实验的时候，由学生助手全程录像，方便学生实验反思和改进。 3. 督促学生课下及时关注自己的实验结果，细胞实验不能下课就结课，细胞是活的实验对象，需要做好长期实验的准备。 	

实验十一 动物贴壁细胞的冻存

教学目标	(1) 掌握细胞冻存的基本原理； (2) 熟练进行细胞冻存的操作；
学习重点	(1) 自主完成贴壁细胞的冻存操作；
学习难点	(1) 基于标准的无菌操作，保证冻存细胞的存活率；
学时分配	4 学时
教学方法	“线上” + “线下” 混合式教学；讲授法；基于问题的教学；演示法
教学手段	传统教学 + 现代多媒体
学习方法	自主探究；文献调研；团队合作
知识结构体系	<pre> graph LR A[贴壁细胞的冻存与复苏] --> B[细胞冻存] A --> C[细胞复苏] B --> B1[概念] B --> B2[原则] B --> B3[操作流程] C --> C1[概念] C --> C2[原则] C --> C3[操作流程] B2 --- B2_1[1. 冷冻保护剂; 2. 缓慢冻存; 3. -196°C 保存] C2 --- C2_1[1. 快速复温; 2. 快速去除二甲亚砜] </pre>

授课题目	实验十一 动物贴壁细胞的冻存	授课序次	NO.12
总学时数	4 学时	授课时长	1 学时
教学过程及授课内容			备注
<p>【网络平台导学内容】</p> <p>1. 学习资源</p> <p>(1) 课件资料：《第九节 贴壁细胞的冻存与复苏》；</p> <p>(2) 慕课资源：中国大学 MOOC，南京师范大学，《细胞生物学实验》；</p> <p>(3) 视频资源：《动物细胞冻存与复苏》实验视频；</p> <p>(4) 沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台；</p> <p>2. 导学作业</p> <p>(1) 类比东北冬天的冻梨，如果直接将细胞冷冻会出现什么样的效果？</p> <p>(2) 你如何看待人体冷冻技术？如果将来科技足够发达，你会选择该项服务么？</p> <p>(3) 目前活体冻存与复苏技术的最大缺陷，你认为是什么？</p> <p>(4) 冷冻保护剂在细胞冻存中的作用是什么？</p> <p>(5) 利用《沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台》了解动物贴壁细胞的冻存与复苏过程。</p> <p>3. 讨论区</p> <p>根据学生在导论作业的互动情况，排查学生比较核心的知识盲区，生成讨论区问题，引导学生进一步解析思考，产生线下学习的内在动力。</p> <p>【课堂导入】</p> <p>【案例】</p> <p>杜虹是重庆知名儿童文学作家，2015 年 5 月 30 日因胰腺癌去世。在去世之前，杜虹以及家人，辗转联系到了一个专门从事人体冰冻研究的科研机构——美国阿尔科生命延续基金会(英文名称 Alcor)。该基金会是目前世界上最大的人体冷冻机构之一。杜虹一家选择了花费 12 万美金(约 75 万元人民币)大脑冷冻。按 Alcor 科学家的乐观估计，50 年后的科学技术也许就能让杜虹解冻头部、再造身体，也就是——复活。</p>			

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。细胞一旦离开活体开始原代培养，它的各种生物特性都将逐渐发生变化，并随着传代次数的增加和体外环境条件的变化而不断有新的变化。因此及时进行细胞冻存十分必要。冻存可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。而且适度地保存一定量的细胞，可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种，起到了细胞保种的作用。除此之外，还可以利用细胞冻存的形式来购买、寄赠、交换和运送某些细胞。

那么，我们今天要学习一下如果冻存复苏细胞，同时动脑思考一下，如果从细胞冻存到生物体的冻存，技术上需要做哪些突破和创新？

【探究新知】

一、实验目的

1. 掌握细胞冻存与复苏的基本原理；
2. 熟练进行细胞冻存与复苏的操作。

二、实验原理

1. 细胞冻存及复苏的基本原则是慢冻快融，实验证明这样可以最大限度的保存细胞活力。

2. 目前常用的保护剂为二甲亚砜（DMSO）和甘油，它们对细胞无毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。这两种物质能提高细胞膜对水的通透性，如向培养液加入保护剂，可使冰点降低。在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水份在冻结前透出细胞，减少细胞内冰晶的形成，从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。

【知识拓展】：在低于 -70°C 的超低温条件下，有机体细胞内部的生化反应极其缓慢，甚至终止。使细胞免受溶质损伤，细胞得以在超低温条件下保存。在不加任何条件下直接冻存细胞时，细胞内和外环境中的水都会形成冰晶，能导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、PH改变、蛋白变性等，能引起细胞死亡。为了避免污染造成的损失，最小化连续细胞系的遗传改变和避免有限细胞系的老化和转化，需要冻存哺乳细胞。冻存细胞前，细胞应该特性化并检查是否污染。

3. 贮存在 -130°C 以下的低温中能减少冰晶的形成。细胞冷冻储存在-

70℃冰箱中可以保存一年之久；细胞储存在液氮中，温度达-196℃，理论上储存时间是无限的。

4. 复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。也不会暴露在高浓度的电解质溶液中过长的时间，从而无冰晶损伤和溶质损伤产生，冻存的细胞经复苏后仍保持其正常的结构和功能。

三、实验器材

1. 材料：人肺癌细胞 A549；
2. 试剂：DMEM 基本培养液、胎牛血清、胰酶、DMSO，PBS。
3. 仪器：倒置显微镜，二氧化碳培养箱，压蒸汽灭菌锅，超净工作台等。

四、实验步骤

1. 细胞冻存

(1) 配制冻存液：10 % DMSO + 20%胎牛血清+70%基本培养液，4℃冰箱保存预冷。

(2) 选对数生长期细胞，在收集细胞 24 h 前换液一次。

(3) 按传代方法把培养细胞制备成悬液，收集到离心管中，800r/min 离心 10min，弃上清液。

(4) 沉淀加冻存液，吹打均匀，计数，调整至 5×10^6 个细胞/ml 左右。

(5) 将悬液分至冻存管中，每管 1 ml。

(6) 将冻存管空封严，贴上标签，写明细胞种类，冻存日期。

(7) 按下列顺序降温：室温 → 4℃冰箱（20min）→ -20℃冰箱（30min）→ -80℃冰箱冻存（或液氮中）长期保存。

2. 细胞复苏

(1) 从低温冰箱或液氮中取出塑料冻存管。

(2) 迅速放入 37℃水浴中，并不断摇动，使其急速融化，30s~1min 内完成。

(3) 冻存管用 70%酒精棉球擦拭消毒后，打开上盖，用吸管将细胞悬液吸到离心管中。

(4) 低速离心（1000r/min）10min，去上清液。后再用培养液洗一次。

<p>(5) 沉淀加 10mL 培养液，吹打均匀后再离心 10min，弃上清液。</p> <p>(6) 加适量培养基后将细胞转移至培养瓶中，置 37℃ 恒温箱中培养，第二天观察细胞生长情况。</p> <p>注意事项：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 保证慢冻快融的原则。 2. 水浴锅内冻存管太多，导致传热不佳，使融化时间延长。 3. 常温下 DMSO 对细胞存在伤害，冻存液需要预降温至 4℃，细胞接触冻存液后要迅速移至低温冰箱内降温。 4. 离心前切记平衡，避免导致离心机损坏和细胞丢失。 5. 一次复苏细胞过多，更换吸头和吸管，避免导致细胞交叉污染。 <p>【讨论提问】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 为什么采用慢冻存慢复苏的原则？ 2. 细胞冻存的数量会不会影响冻存效果？ <p>【本课小结】</p> <p>掌握细胞冻存和复苏的技术流程，熟练无菌操作技术。在掌握传代培养的基础之上，进行细胞的冻存，并通过复苏实验验证无菌操作效果和细胞存货情况。</p> <p>【课后作业】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 完成并分析你所做的细胞冻存及复苏实验。 2. 记录复苏细胞的贴壁时间及数量，对冻存效果进行评估。 	
教学反思	
<p>2. 两个实验相辅相成，自己冻存细胞，自己复苏细胞，经过两次独立的实验操作，本实验应该由学生完全独立完成，最好形成开放实验室的模式，由学生自主决定何时做实验，何时收集结果，形成独立自主的操作习惯。</p>	

附：教学大纲

《细胞生物学实验》课程教学大纲

(Cell Biology Experiment)

一、课程说明

课程名称及代码：细胞生物学实验/02301670

课程性质：专业必修

课程学分：1.5

开课学期：第四学期

适用专业：生物科学专业(师范)

课程总学时：48

课程周学时：4

先修课程：动物学、植物学、生物化学、植物生理学

二、课程目标

1. 课程目标内容

课程目标 1：学生可以科学解读细胞生物学实验原理，规范开展植物细胞骨架标本制作、植物原生质体分离及诱导融合、细胞器超活染色、动物细胞常规培养等实验操作；具有独立完成细胞生物学综合实验的能力。

课程目标 2：学生能够掌握细胞生物学的基本研究方法，并了解生物显微镜、细胞融合技术及动物细胞培养等技术在社会实践和科学研究领域中的应用价值。

课程目标 3：学生通过不同类型实验的训练，逐渐形成信息收集整理、创新、反思等科学素养，在细胞生物学相关研究和实践中，形成主动分析和解决问题的意识和能力。

2. 课程目标与毕业要求的对应关系

毕业要求指标点		课程目标 (支撑度)
3. 学科素养	3-2. 具备基础的生物学实验操作技能，具备解读实验原理、执行生物实验室操作规范、撰写实验研究报告等素养，具有独立开展验证性或综合性实验的经验。	课程目标 1 (H)

3. 学科素养	3-3. 知晓生物学相关领域的基本发展规律，理解生物学科知识体系基本思想和研究方法，了解生物相关知识技能与社会实践的联系与应用。	课程目标 2 (M)
毕业要求指标点		课程目标 (支撑度)
7. 学会反思	7-2. 具备一定的生物专业创新意识，可以运用批判性思维和反思方法，分析和解决生物专业学习和中学生物教学过程中存在的实际问题。	课程目标 3 (L)

(注：H 代表课程分目标与毕业要求分指标点为高支撑，M 代表中支撑，L 代表低支撑。)

3. 课程目标与课程教学内容的对应关系

章次	内容	支撑课程目标
一	普通光学显微镜的调试与观察	课程目标 1. 2
二	暗视野显微镜的制作与使用	课程目标 1. 2
三	细胞膜的渗透性及意义	课程目标 2. 3
四	液泡系及线粒体的活体染色与观察	课程目标 1
五	植物细胞骨架的光学显微镜观察	课程目标 1. 2
六	植物原生质体的分离与诱导融合	课程目标 1. 2. 3
七	动物细胞培养的无菌化准备	课程目标 1
八	动物细胞传代培养的虚拟仿真实训	课程目标 1
九	动物贴壁细胞的复苏	课程目标 1. 2. 3
十	动物贴壁细胞的传代培养	课程目标 1. 2. 3
十一	动物贴壁细胞的冻存	课程目标 1. 2. 3

三、课程教学与学习方法

1. 教学方法

(1) “线上” + “线下” 混合式教学

建立线上学习资源平台，设置“导学作业”引导学生思考，其中“导学作业”主要为具有启发意义的高阶性问题、程序性问题，主要侧重于“实验原理的剖析”，“实验步骤的设置逻辑”，“实验结果的推断”等；循序渐进的、逐步引导学生开展“信息收集整理”、“思维训练”、“主动探究”等自主学习行为，促进学生表述个人观点，关注别人的见解，以更加开阔的心态开展学习活动。

(2) 形成性讲授法

在教学目标既定的前提下，基于多媒体教学手段，采用形成性课堂教学。主要根据学生线

上学习出现的个性化问题、知识盲区或者核心知识冲突开展课堂教学，引导学生在剖析实验原理的基础上理解实验步骤的合理性，课堂教学辅助学生完成知识的验证和逻辑结构的形成。

（3）基于问题的教学

线上和线下均积极开展基于问题的情景化教学，将“知识形态”转变为“问题形态”，将核心知识点以情境下的问题形态交代给学生，鼓励学生自主探究该情境下的解决方法，由教师的“主动教”转变为学生的“主动学”。

2. 学习方法

（1）主动探究

学生在开展课堂学习之前，需要在网络教学平台进行先行的自学活动，主要通过解决教师提供的导学问题，完成对本节新课内容的了解和初步探究，形成基本的理论知识铺垫和思考。鼓励同学根据自己的认知情况，自主设计试验方案，在课堂开展实验验证和探究。

（2）文献调研

针对本课程的前沿性知识动态，可以通过文献调研拓展自己的专业知识领域，同时对于导学内的知识盲区可以通过文献调研的方式进行弥补和解答。

（3）团队合作

线上和线下学习中，建议同学开展积极的小组讨论、团队合作等学习方式，通过积极的讨论、实践完成知识的学习探究过程，主动的发现问题、解决问题。

四、教学内容

1. 教学内容与学时分配

章次	内 容	学时
实验一	普通光学显微镜的调试与观察	4
实验二	暗视野显微镜的制作与使用	4
实验三	细胞膜的渗透性及意义	4
实验四	液泡系及线粒体的活体染色与观察	4
实验五	植物细胞骨架的光学显微镜观察	4
实验六	植物原生质体的分离与诱导融合	4
实验七	动物细胞培养的无菌化准备	8
实验八	动物细胞培养的虚拟仿真实训	4
实验九	动物贴壁细胞的复苏	4

实验十	动物贴壁细胞的传代培养	4
实验十一	动物贴壁细胞的冻存	4

2. 教学内容纲要

实验一、普通光学显微镜的调试与观察（4 学时）（支撑课程目标 1.2）

1. 学习目的与要求

- （1）掌握普通光学显微镜的标准操作；
- （2）学会光学显微镜光路合轴的调试；
- （3）通过人口腔上皮细胞形态的规范观察，进行标准的生物绘图；

2. 学习重点

- （1）知晓光学显微镜每个结构的功能和标准使用方法；
- （2）掌握光路合轴标准的调节方法；

3. 学习难点

- （1）标准化操作光学显微镜的光路合轴；

4. 主要内容

在了解光学显微镜详细结构及观察原理基础上，进行光路合轴的调试操作。并制作人口腔上皮细胞标本，完成一次标准的光学显微镜观察，了解生物绘图规范。

5. 课后参考作业：

- （1）10 倍或 40 倍镜视野下，标准的绘制人口腔上皮细胞生物绘图。

实验二、暗视野显微镜的制作与使用（4 学时）（支撑课程目标 1.2）

1. 学习目的与要求

- （1）掌握暗视野显微镜的工作原理及使用方法；
- （2）了解暗视野显微镜的观察特点；

2. 学习重点

- （1）理解暗视野显微镜的成像原理；

3. 学习难点

- （1）理解暗视野显微镜的实际应用；

4. 主要内容

在了解暗视野显微镜观察原理基础上，利用普通光学显微镜制作基本的暗视野观察情境，利用浮游生物（如剑水蚤等）进行暗视野显微镜观察，拍照记录实验结果，对比分析暗视野显微镜和普通光学显微镜观察图像的区别。

5. 课后参考作业:

- (1) 对浮游生物进行暗视野效果观察。
- (2) 对比观察普通光学显微镜和暗视野显微镜观察浮游生物图像的差别。
- (3) 如果挡光板制作的时候出现残缺的瑕疵, 是否会影响观察效果? 举例说明。

实验三、细胞膜的渗透性及意义 (4 学时) (支撑课程目标 2.3)

1. 学习目的与要求

- (1) 理解血细胞测试细胞膜选择透过性的原理;
- (2) 通过单盲实验, 理解实验误差产生的原因, 认真对待科学研究的严谨性;

2. 学习重点

- (1) 通过组间数据对比, 分析了解实验误差产生的原因, 进而规范个人实验操作;

3. 学习难点

- (1) 通过实验原理的解读, 对预设实际进行溶血速度的预判, 并开展单盲实验;

4. 主要内容

设置单盲实验, 通过实验原理的解读, 预判 8 种试剂进入细胞膜的速度 (时间), 并通过实验操作进行验证。通过组间数据的比较, 了解标准化操作、组内重复、实验误差等科学研究基本方法论的核心理念。

5. 课后参考作业:

- (1) 记录实验结果并分析不同组合物质进入细胞膜速度不同的原因 (按极性、分子大小等分析)。
- (2) 分析数据并讨论本组数据产生误差的可能原因。

实验四、液泡及线粒体的活体染色与观察 (4 学时) (支撑课程目标 1)

1. 学习目的与要求

- (1) 掌握细胞器超活染色的原理及应用领域。
- (2) 利用詹纳斯绿 B 染色, 观察线粒体的基本形态与分布。
- (3) 利用中性红染色, 观察植物液泡的形态与分布。

2. 学习重点

- (1) 总结归纳不同超活染色的原理区别;
- (2) 自主探究超活染色的应用领域;

3. 学习难点

- (1) 超活染料与细胞器之间的匹配，才能实现超活染色，理解其实验设计理念。

4. 主要内容

活体染色是指对生活有机体的细胞或组织能着色但没有毒害的一种染色方法。线粒体内膜上分布有细胞色素氧化酶，该酶能使詹姆士绿 B 保持在氧化状态，呈现蓝绿色从而使线粒体显色，而细胞质中的染料被还原成无色。液泡是细胞内浓缩产物的主要场所。中性红是液泡的特殊染色剂，将液泡染成红色。利用该原理对人口腔上皮细胞/洋葱表皮细胞进行相应细胞器的染色观察。

5. 课后参考作业：

- (1) 绘制线粒体和液泡的形态图，并描述其分布及形态，并对实验结果进行分析总结。

实验五、植物细胞骨架的光学显微镜观察（4 学时）（支撑课程目标 1.2）

1. 学习目的与要求

- (1) 掌握植物细胞骨架标本的基本制备方法；
- (2) 掌握考马斯亮蓝 R250 对细胞骨架的染色方法；
- (3) 理解细胞骨架标本制作方法的设计原理；

2. 学习重点

- (1) 理解植物细胞骨架标本的制作原理；
- (2) 理解每级试剂设置在本实验系统内的作用；

3. 学习难点

- (1) 理解细胞骨架染色操作关键因素对实验结果的影响，并能科学分析实验结果。

4. 主要内容

本实验采用去垢剂 Triton-100 的缓冲液处理植物材料，可将细胞的膜结构和大部分蛋白质抽提掉，但细胞骨架系统的蛋白却被保存下来。用考马斯亮蓝 R250 染色，酸性溶液中与蛋白质结合显蓝色，胞质背景着色弱利于细胞骨架纤维显示。观察植物细胞骨架的形态及分布特点。

5. 课后参考作业：

- (1) 10 倍或 40 倍镜视野下，进行植物细胞骨架生物绘图，并对实验结果进行分析总结。

实验六、植物原生质体的分离与诱导融合（4 学时）（支撑课程目标 1.2.3）

1. 学习目的与要求

- （1）掌握获得植物单细胞的两种基本方法；
- （2）学会酶解法制备植物原生质体；
- （3）组内协作完成 PEG 诱导的植物原生质体诱导融合；
- （4）文献调研了解细胞融合技术的前沿应用进展；

2. 学习重点

- （1）酶解法获得植物单个细胞和原生质体的技术要领；
- （2）掌握 PEG 诱导植物细胞融合的方法；

3. 学习难点

- （1）获得活性较高的植物原生质体，提高诱导融合比率

4. 主要内容

利用酶解法（纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶），辅以机械法获得植物原生质体，利用 PEG 诱导植物原生质体融合，并进行观察。介绍植物及动物获得单细胞的方法及原理，诱导动物细胞（植物原生质体）的方法，并拓展有关细胞融合技术在单克隆抗体制备领域的应用。

5. 课后参考作业：

- （1）10 倍或 40 倍镜视野下，植物原生质体诱导融合过程生物绘图，对实验结果进行分析总结。
- （2）文献调研了解细胞融合技术的前沿应用进展；

实验七、动物细胞培养的无菌化准备（8 学时）（支撑课程目标 1）

1. 学习目的与要求

- （1）掌握无菌室无菌化准备流程及方法；
- （2）掌握动物细胞培养各类仪器器皿的无菌化处理方法及标准；

2. 学习重点

- （1）各种操作对象的无菌化标准及方法；

3. 学习难点

- （1）形成较为系统的无菌操作意识，并认识到无菌操作的严谨性；

4. 主要内容

通过团队协作，完成动物细胞培养前期的无菌化准备工作，主要包括实验室、基本仪器、器皿及试剂的无菌化处理（清洗、消毒、试剂分装等），掌握无菌化准备的基本流程及严谨性，为后期细胞培养工作做好筹备工作。

5. 课后参考作业：

- （1）记录无菌化准备的基本流程，形成可行性技术路线图；

实验八、动物细胞传代培养的虚拟仿真实训（4 学时）（支撑课程目标 1）

1. 学习目的与要求

- （1）通过虚拟实验室，对动物贴壁细胞的培养过程形成感性认知；
- （2）完成动物贴壁细胞传代培养的实训操作；

2. 学习重点

- （1）独立完成贴壁细胞的传代培养操作；

3. 学习难点

- （1）动物细胞培养无菌操作理念的形成；

4. 主要内容

通过动物细胞培养虚拟实验室的操作，基本了解细胞培养的基本流程，通过实验室实训，独立完成一次细胞传代操作，并规范个人无菌操作习惯。

5. 课后参考作业：

- （1）完成超星泛雅平台有关细胞操作的视频观摩。

实验九、动物贴壁细胞的复苏（4 学时）（支撑课程目标 1.2.3）

1. 学习目的与要求

- （1）掌握细胞复苏的基本原理；
- （2）熟练进行细胞复苏的操作；

2. 学习重点

- （1）自主完成贴壁细胞的复苏操作；

3. 学习难点

- （1）基于标准的无菌操作，保证复苏细胞的存活率；

4.主要内容

在掌握基本无菌操作的基础之上，独立完成一次复苏实验，保证无菌操作规范。

5.课后参考作业：

- (1) 拍照记录复苏的细胞状态；
- (2) 在下次实验，拍照记录细胞贴壁的状态，对冻存效果进行评估；

实验十、动物贴壁细胞的传代培养（4 学时）（支撑课程目标 1.2.3）

1. 学习目的与要求

- (1) 掌握动物贴壁细胞传代培养的基本操作过程；
- (2) 观察体外培养细胞的形态及生长状态；
- (3) 熟练无菌操作技术；

2. 学习重点

- (1) 能够独立、标准化的进行动物贴壁细胞的传代；

3. 学习难点

- (1) 在传代的过程中注意无菌操作的严格性；
- (2) 了解细胞需要传代的判定标准；

4. 主要内容

基于无菌化操作，掌握动物细胞常规培养条件，进行贴壁细胞的传代培养工作。

5. 课后参考作业：

- (1) 记录独立开展传代培养的操作心得和体会；
- (2) 拍照记录细胞传代后的形态，通过对比贴壁前后细胞的状态，对细胞的活性和无菌操作情况进行判断；

实验十一、贴壁细胞人肺癌细胞 A549 的冻存（4 学时）（支撑课程目标 1.2.3）

1. 学习目的与要求

- (1) 掌握细胞冻存的基本原理；
- (2) 熟练进行细胞冻存的操作；

2. 学习重点

- (1) 自主完成贴壁细胞的冻存操作；

3. 学习难点

- (1) 基于标准的无菌操作，保证冻存细胞的存活率；

4. 主要内容

在掌握传代培养的基础之上，独立完成一次细胞的冻存，主要包括细胞的消化判定、细胞吹打效果、梯度降温等，并验证个人无菌操作和细胞存活情况。

5. 课后参考作业：

- (1) 完成并分析你所做的细胞冻存实验。

五、考核内容及方式

1. 学生成绩评价方式

课程目标	权重	评价方式
课程目标 1	0.5	1. 课堂表现测评 2. 期末测试
课程目标 2	0.3	1. 网络平台测评 2. 课堂表现测评 3. 期末测试
课程目标 3	0.2	1. 网络平台测评 2. 期末测试

2. 学生成绩评定方法

(1) 总评成绩计算方法

总评成绩=50%课堂表现测评+20%期末测评+10%课程音频学习+10%线上作业+10%课程积分

课堂表现测评=10%出勤+10%课堂互动+60%实验操作+20%报告册书写

课程目标 \ 比例	课堂表现 分数分配比例%	期末测试 分数分配比例%	网络平台测评 分数分配比例%
课程目标 1	60	20	
课程目标 2	40	50	50
课程目标 3		30	50

(2) 评分标准

评分标准					
评价 方式	评价内容	90-100 分	75-89 分	60-75 分	小于 60 分
		优	良	合格	不及格
课 堂 表 现 测 评	出勤	无缺勤	缺勤 1 次	缺勤 2 次	缺勤 3 次及以上
	课堂互动	能够主动回答问题，回答逻辑清楚，能够正确回答问题	能够主动回答问题，回答逻辑较为清楚，基本可以解决问题	能够回答问题，回答逻辑较为清楚，内容基本正确	未主动回答问题；回答问题逻辑混乱，不能解决问题
	实验操作	准确理解实验原理和方法，能够独立开展标准化的操作实验	理解实验原理和方法，能够开展较为标准化的操作实验	了解实验原理和方法，可以开展较为标准化的操作实验	未清楚了解实验原理和方法，不能开展标准化的操作实验

评分标准					
	评价内容	90-100 分	75-89 分	60-75 分	小于 60 分
		优	良	合格	不及格
	报告册书写	报告册书写格式标准，内容表述科学，能对实验结果进行客观合理的分析总结	报告册书写格式较为标准，内容表述较为科学，对实验结果进行初步的分析总结	报告册书内容较为完整，对实验结果进行了分析总结，有待改善	报告册书写格式混乱，内容科学性欠缺，未能对实验结果进行分析总结
期末检测	实验操作技能的掌握情况	准确掌握实验操作执行标准的各项要求	掌握实验操作执行标准的基本要求	基本了解实验操作执行标准的要求	尚未了解实验操作执行标准的的基本要求
	实验原理及方法的理解情况	准确理解实验原理的内涵及实验方法的应用	理解实验原理的内涵及实验方法的应用	较为理解实验原理的内涵及实验方法的应用	尚未掌握实验原理的内涵及实验方法的应用
	实验反思及应用掌握情况	针对实验情景能够进行积极准确的反思，并给出正确的分析解释	针对实验情景能够进行反思，给出较为正确的分析解释	针对实验情景能够开展反思，但是其分析解释的合理性有待加强	针对实验情景不能开展合理的反思，无法给出分析解释
网络平台测评	解决问题的方法及方案的正确性和合理性	提出合理的问题解决方法和方案	提出较为合理的问题解决方法和方案	试图提出问题解决方法和方案，但有待强化其合理性	不能提出解决方案；或方案基本无效
	开展自主探究、创新反思的情况	能够积极的进行自主探究学习，开展有效的创新和反思尝试	能够进行自主探究学习，开展创新和反思尝试	能够完成教师布置的自主探究性任务，进行创新或反思尝试	未完成自主探究性任务

3. 课程达成度评价方法

(1) 课程目标达成度评价方法

比例 课程目标	课堂表现测 评权重	网络平台 作业测评	期末检测 权重	课程分目标达成评价方法
课程目标 1	0.7		0.3	课程目标 1 达成度=0.7×(课堂表现测评平均成绩/课堂表现测评总分)+0.3×(期末检测平均成绩/ 期末检测总分)
课程目标 2	0.4	0.3	0.3	课程目标 2 达成度=0.4×(课堂表现测评平均成绩/课堂表现测评总分)+0.3×(期末检测平均成绩/ 期末检测总分)+ 0.3×(网络平台作业测评平均成绩/ 网络平台作业测评总分)
课程目标 3		0.7	0.3	课程目标 3 达成度=0.3×(期末检测平均成绩/ 期末检测总分)+ 0.7×(网络平台作业测评平均成绩/ 网络平台作业测评总分)

(2) 课程达成度评价方法

课程目标达成度=0.5*课程目标 1 达成度+0.3*课程目标 2 达成度+0.2*课程目标 3 达成度

六、推荐教材及学习参考资料

1. 推荐教材

(1)《细胞生物学实验教程》(第二版),王金发等,科学出版社,2011.

参考书目:

(1)《细胞生物学实验教程》(第三版),安利国等,科学出版社,2015.

(2)《细胞生物学实验》(第二版),杨汉民,高教出版社,1995.

(3)《细胞实验指南》(上、下),D.L.斯佩克特,科学出版社,2003.

2. 学习参考资料

(1) 沈阳师范大学动物细胞培养虚拟教学平台

(2) 沈阳师范大学网络教学平台: <http://210.30.208.205>

(3) 沈阳师范大学超星智慧教学平台: <http://synudx.fanya.chaoxing.com/portal>

撰写人（签字）： 王泽

审定人（签字）：张颖

单位负责人（签字）：刘新宇

单位（盖章）：

时间： 2023 年 12 月 31 日