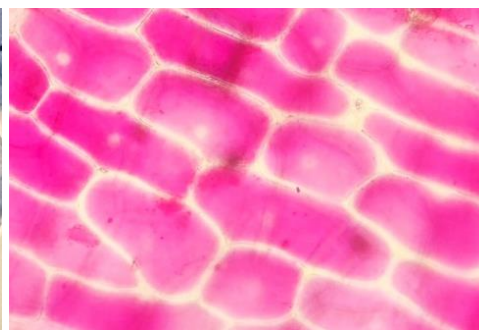
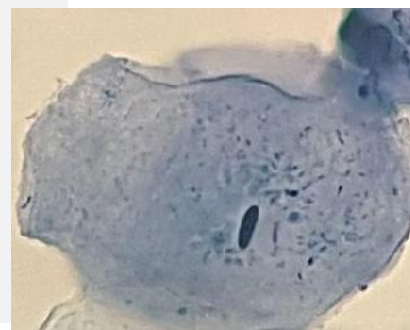


回顾

1. 显微镜的“专业”操作。
2. 标准的生物科研绘图。
3. 暗视野下神奇的世界。
4. 实验设计：单盲、双盲、阳性对照、阴性对照。
5. 实验数据处理理念：组内重复，组间差异和组内差异。
6. 染色：①詹纳斯绿B染色（原理）
②中性红染色



实验五 植物细胞骨架的 光学显微镜观察

预习问题

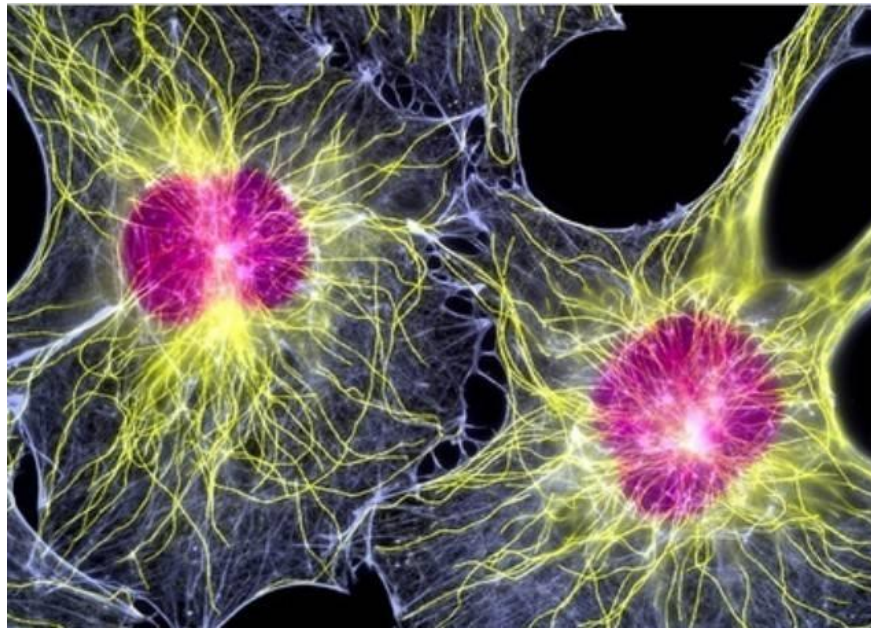
- 细胞骨架的功能、分布、组成成分？
- 除了考马斯亮蓝染色，其它的细胞骨架染色方法？
- 考马斯亮蓝为什么可以染细胞骨架？
- 为什么考马斯亮蓝能特异性的对细胞骨架染色？
- 曲拉通的生物学作用？
- M-缓冲液的作用？
- 戊二醛在本实验里的作用。

一、实验目的

- ❖ 掌握植物细胞骨架标本的基本制备方法；
- ❖ 掌握考马斯亮蓝R250对细胞骨架的染色方法；
- ❖ 理解细胞骨架标本制作方法的设计原理（前辈们是怎么想的？）；

二、实验原理

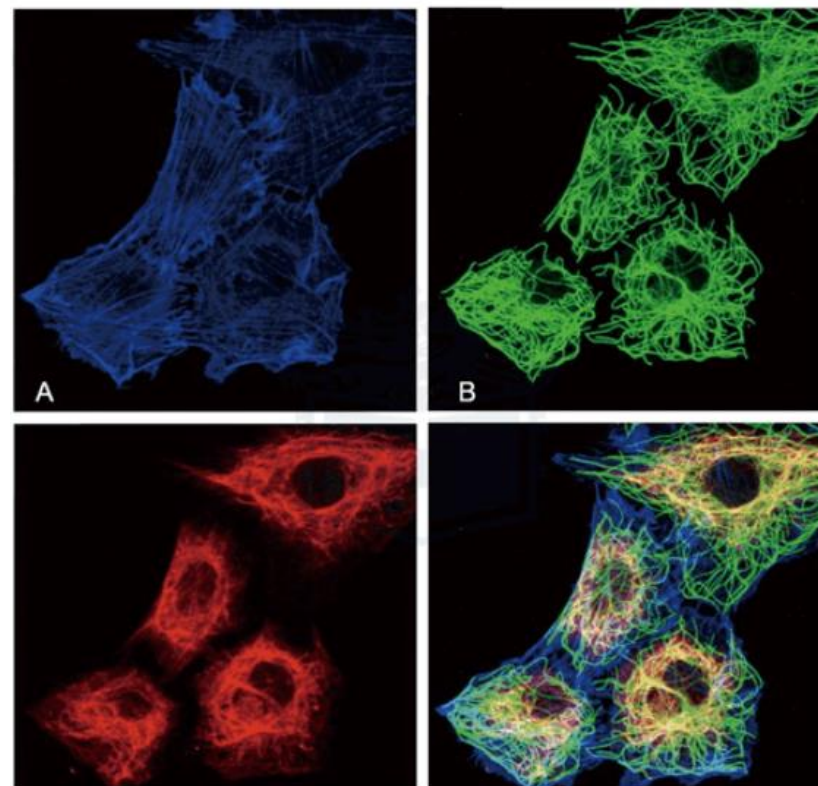
实验对象：细胞骨架（分布、成分、形态、功能）



图：老鼠成纤维细胞的荧光蛋白和微管 (结构蛋白)，1000x
2003尼康年度微型照片大赛: Torsten Wittmann, Scripps研究院

细胞骨架：

- 广义的细胞骨架：细胞核骨架、细胞质骨架、细胞膜骨架、细胞外基质。
- 狭义的细胞骨架：细胞质骨架，分为微丝、微管和中间纤维。

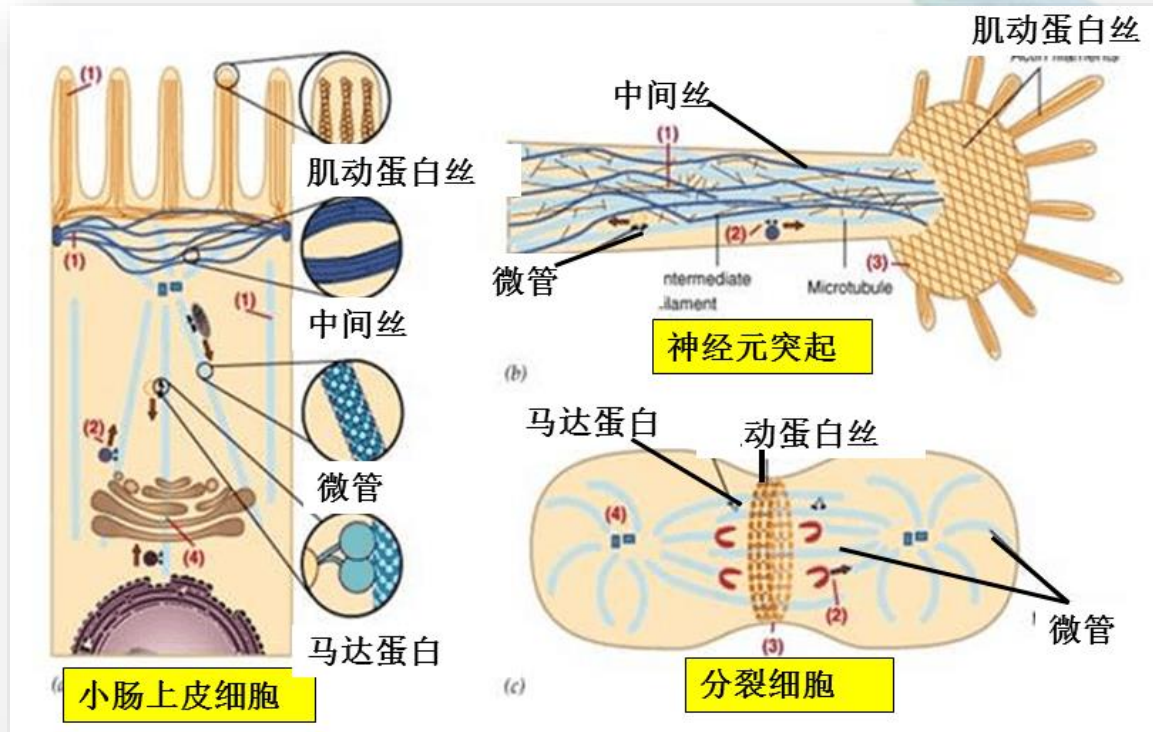


A:微丝 (MF)， B:微管 (MT)
C:中间丝 (IF)， D:叠加图像

细胞骨架 (cytoskeleton) 是细胞以蛋白质纤维为主要成分的网络结构。

细胞骨架的功能

- ❑ 维持细胞的形态结构、内部结构的合理排布起支架作用！
- ❑ 对于细胞运动与细胞器的位移、物质运输、能量转换、基因表达、蛋白合成，信号传导和细胞分裂等有重要作用。
- ❑ 细胞骨架的异常可引起多种疾病，如遗传病、肿瘤神经系统疾病等。



实验对象



形状：
致密的网状

预测的观察结果

分布：
细胞核、细胞质、细胞膜、细胞间质。

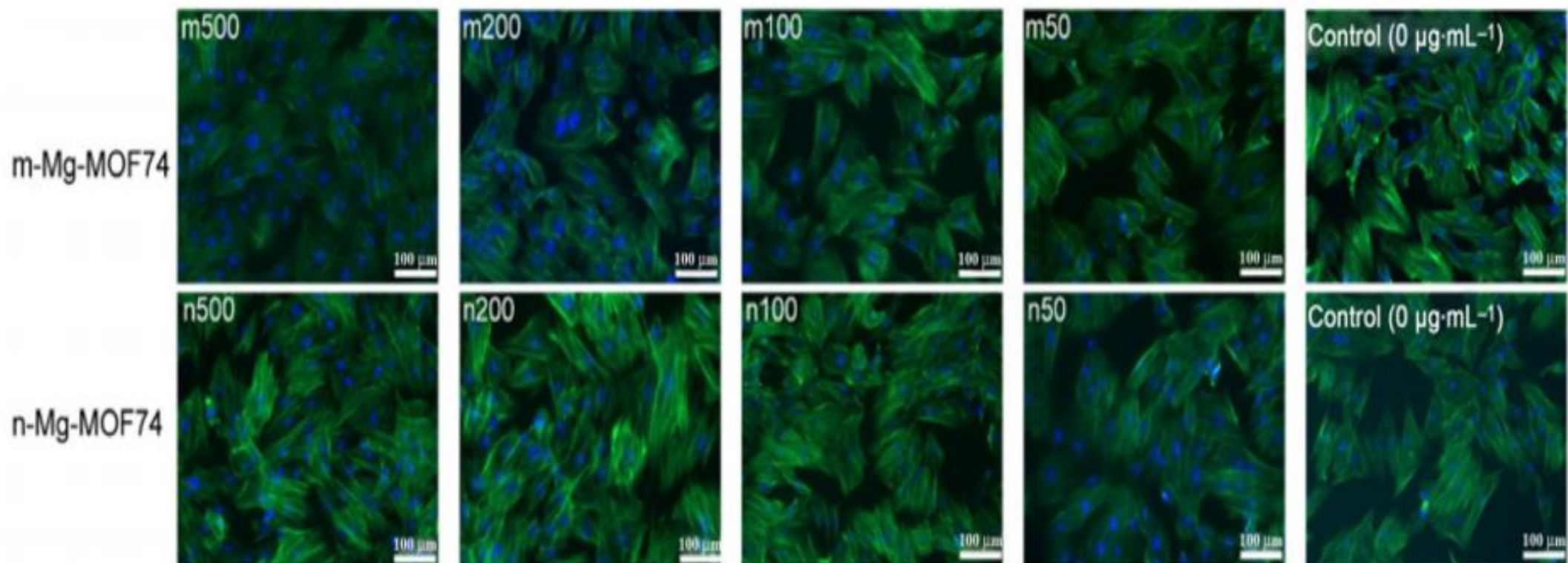
主要组成：
蛋白质

被利用的特性

功能：
架维持细胞的形态结构，内部结构的合理排布起支架作用！
细胞运动与细胞器的位移、物质运输、能量转换、基因表达、蛋白合成，信号传导和细胞分裂等。

常用的细胞骨架的观察方法：

荧光素标记的鬼笔环肽染色法、间接免疫荧光法、**考马斯亮蓝R250染色法等。**



实验对象：细胞骨架

主要成分：蛋白质

既然是个蛋白质网络，找个专门染蛋白质的染料就好了

考马斯亮蓝（蛋白质特异性染料）

细胞浑身遍布蛋白质，如：

- ① 细胞膜、细胞质、细胞核
- ② 溶解性蛋白质、结合性蛋白质
- ③ 细胞骨架蛋白、非细胞骨架蛋白

巴拉巴拉巴拉，好多好多蛋白，都很喜欢考马斯亮蓝.....

如果直接加在洋葱表皮细胞上.....



我是细胞，蓝色的胖子

为什么？



如何让考马斯亮蓝特异性的显色细胞骨架呢？

曲拉通来啦，曲拉通可以特异性识别细胞骨架，让它在暴风骤雨中独活？

- ① 起到将膜蛋白从细胞膜上解离下来的作用
- ② 对蛋白质的变性作用较小，作用温和，但是能溶解脂质，所以可以除去膜系统，留下细胞骨架蛋白和其它大部分的蛋白质。
- ③ 适当浓度的TritonX100处理细胞时，因其非离子型表面活性剂的特性，已经除去可溶性蛋白质和脂类，而微丝束属不可溶性蛋白，就不会被TritonX-100破坏而保留
- ④ 能溶解脂质，去除膜系统，并与大部分非骨架蛋白疏水区结合而将其溶掉，
- ⑤ 曲拉通是一种非离子表面活性剂，能与生物膜中的磷脂等脂质结合形成可溶性复合物，疏水端也能与膜蛋白的疏水区结合形成复合物，溶解于溶液中，将膜蛋白从细胞膜上解离下来，
- ⑥ 细胞骨架在用非离子去垢剂处理时会保持非溶解状态。

- ① 将膜蛋白从细胞膜上解离下来：很好，细胞膜骨架没有了。
- ② 能溶解脂质：很好，增加了细胞膜的通透性
- ③ 曲拉通温和，留下细胞骨架蛋白和其它大部分的蛋白质：这是个坑，如果大部分蛋白质都留下了，还用曲拉通有何用？
- ③ 适当浓度的TritonX100处理细胞时，微丝束属不可溶性蛋白，就不会被TritonX-100破坏而保留：请注意“适当浓度”，弦外之音，如果浓度不当，细胞骨架也会没了。
- ④ 去除膜系统，并与大部分非骨架蛋白疏水区结合而将其溶掉：骨架蛋白的疏水区呢？其实一样可以结合。
- ⑤ 细胞骨架在用非离子去垢剂处理时会保持非溶解状态。：请注意，是“保持”非溶解状态，说明细胞骨架没有改变状态而已。



如何让考马斯亮蓝特异性的显色细胞骨架呢？

事实上，曲拉通是这样的

- 一、曲拉通可以去除脂质，增加细胞膜的通透性，让曲拉通更好的进入细胞内部
- 二、曲拉通可以去膜蛋白，增加细胞膜的通透性，细胞膜骨架没了
- 三、曲拉通可以去除大部分溶解性蛋白，细胞质内可溶性蛋白没了，甚至脆弱的细胞骨架
- 四、曲拉通适当浓度下，细胞骨架可以以非溶解状态，也就是组装状态存在，
因为它是骨架，相对于其它蛋白质，它足够结实和稳定。
- 五、如果曲拉通浓度不恰当、时间不恰当，细胞骨架也会被抽提干净，
所以曲拉通对蛋白质的抽提没有选择性。

考马斯亮蓝如何达到对细胞骨架的特异性染色？有识别功能？

曲拉通对细胞骨架有识别功能？

本实验的
成败在哪
一举？

1

细胞骨架

- 网状；
- 主要成分为蛋白质；
- 结构致密；

2

考马斯亮蓝

- 蛋白质特异性染料

3

曲拉通

- 可以抽提蛋白质，无特异性；
- 细胞骨架相对结构牢固；
- 控制曲拉通的作用时间和强度，绝大部分细胞骨架不被曲拉通处理掉。

4

细胞骨架“大概的”样子 vs 超活染色

- 可以抽提蛋白质，无特异性；
- 细胞骨架相对结构牢固；

三、实验材料及试剂

(1) 实验材料：洋葱（磷酸缓冲液PBS浸泡8h），人口腔上皮

(2) 实验器材：显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、滴管、烧杯

(3) 实验试剂

- pH6.8的磷酸缓冲液 (PBS)
- 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: 曲拉通，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。

接下来的故事是这样的

被曲拉通虐待的摇摇欲坠，
急需摆脱曲拉通的处理

这个东西可能比较陌生，可是福尔马林
应该熟悉一点，他俩的原理很像，固定
尸体，戊二醛固定了细胞骨架的尸体

细胞
骨架

M缓冲
溶液

戊二
醛

PBS

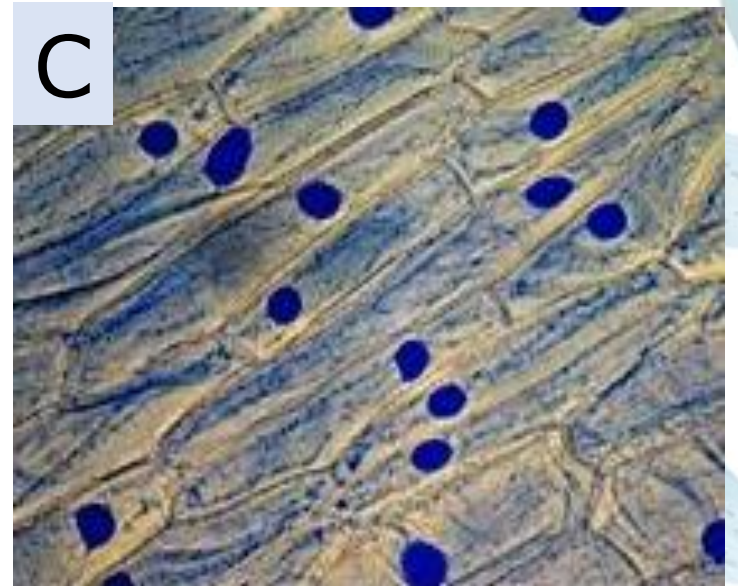
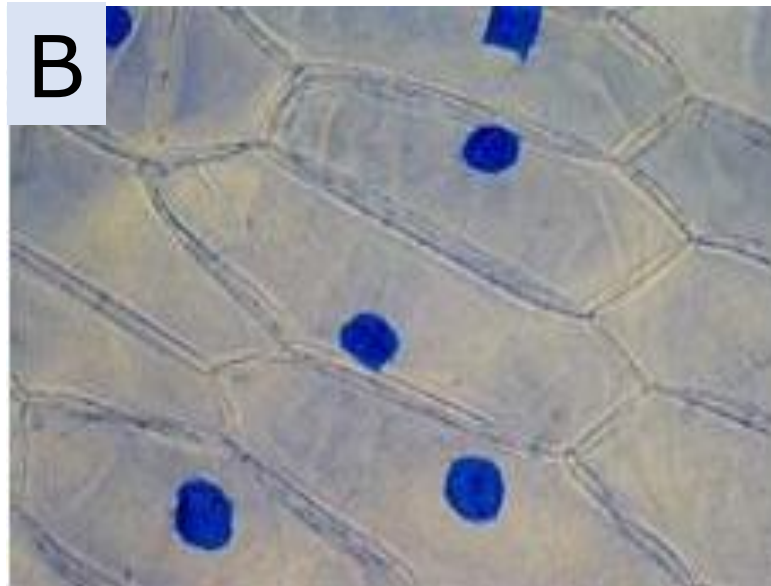
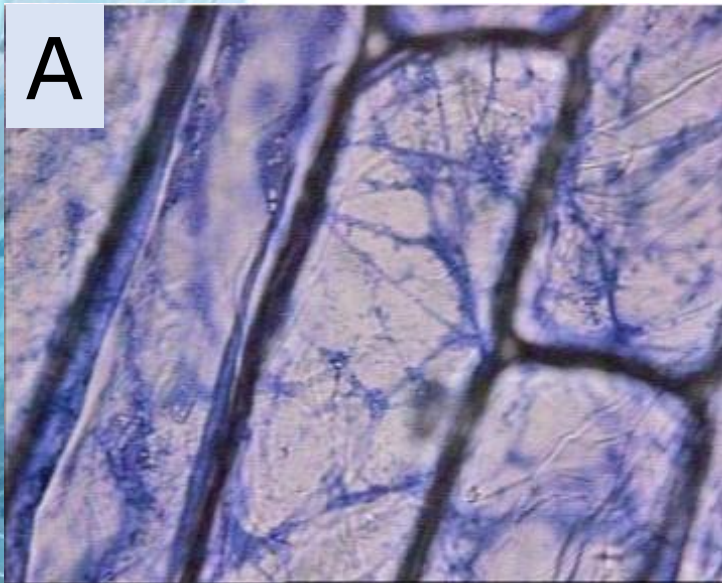
这可不是普通的溶液
既能洗掉曲拉通，还能稳定住细
胞骨架

很经典的缓冲溶液，可
以清洗活的东西。M？

四、实验步骤

- ❖ 取洋葱表皮，1% 曲拉通处理15-20min, 期间间断搅拌；
- ❖ 吸去曲拉通，M缓冲液洗3次，每次3min；
- ❖ 3%戊二醛固定20min, 不要晃动；
- ❖ PBS清洗3次，每次3min, 期间不停搅拌；
- ❖ 考马斯亮蓝R250 染色15-25min；
- ❖ 自来水清洗至清水；
- ❖ 置于载玻片上展开，光学显微镜下观察（无需盖盖玻片）。

分析一下三个实验结果

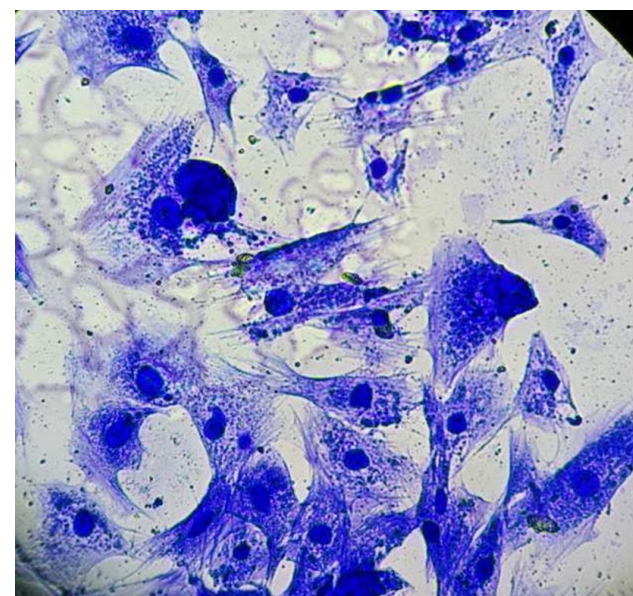
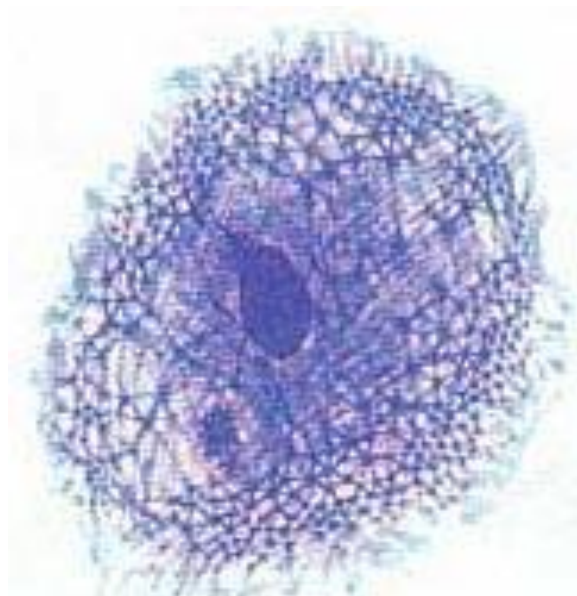


人口腔上皮细胞骨架染色

实验步骤

- (1) 漱口，取人口腔上皮细胞，PBS中涂片、**烘干**；
- (2) **M缓冲溶液清洗3次，3min/次**；
- (3) Triton X-100处理6min；
- (4) M缓冲液漂洗3次，3min/次；
- (5) 3%戊二醛固定15min，PBS洗3次；
- (6) 考马斯亮蓝R250染色5~10 min，PBS洗3次；
- (7) 盖玻片，光学显微镜观察。

人口腔上皮细胞骨架 考马斯亮蓝染色



五、注意事项

- (1) 该静止静止，该摇晃摇晃；
- (2) 注意曲拉通处理时间和强度！
- (3) 洋葱表皮扔垃圾桶！
- (4) 注意显微镜、桌面卫生（染色），小烧杯用洗涤剂清洗干净！

六、作业

- 1.标准生物绘图：洋葱表皮细胞骨架形态，并对实验结果进行分析。
- 2.本实验结果最有可能显示的是微丝？微管？中间纤维？原因？

思维导图

