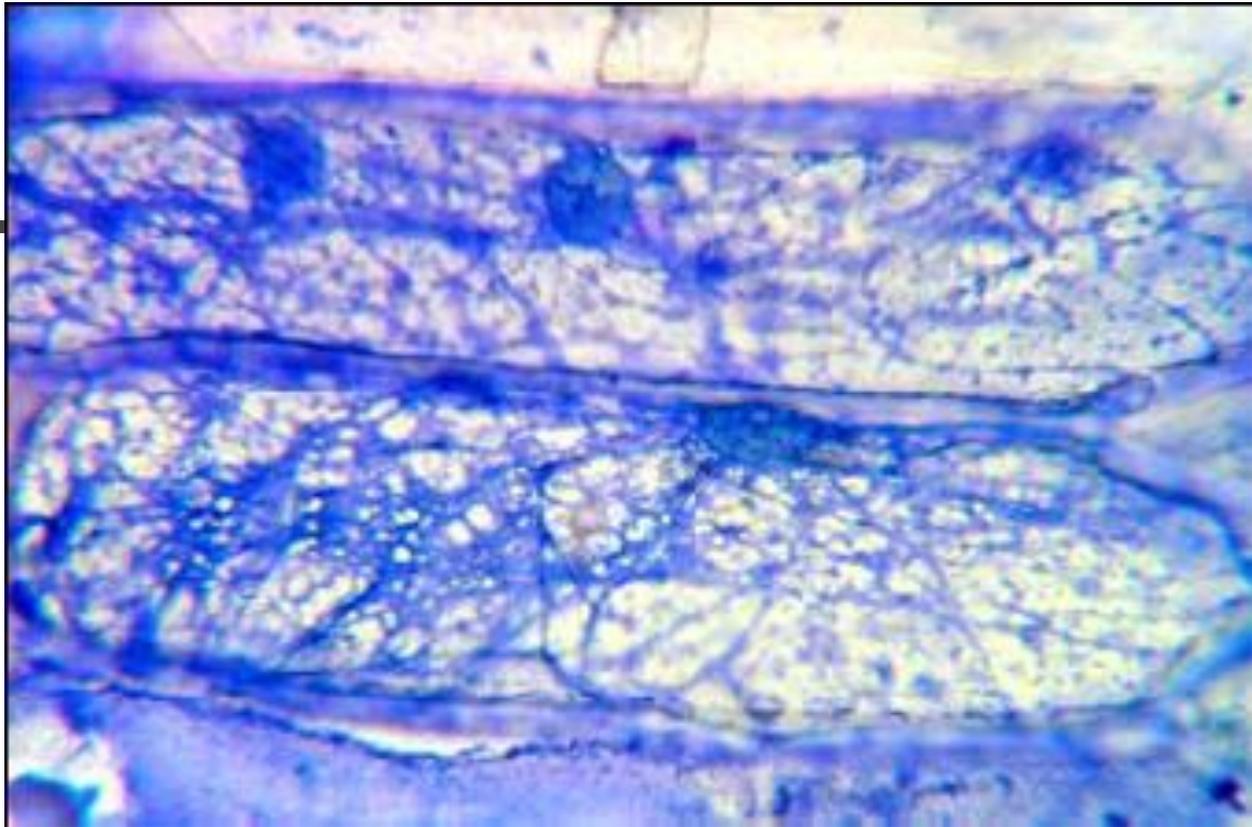
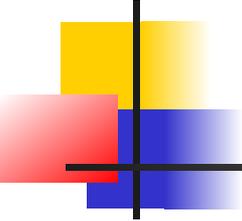
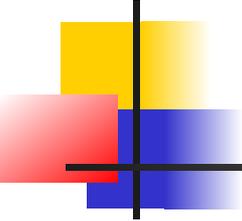


实验三 细胞骨架的显示和观察



- 
-
- 细胞内由微丝、微管、中间纤维等交织形成一个十分复杂的立体网络结构。它们对于细胞形状的保持、细胞内物质运输、细胞运动、细胞内各结构相对位置的固定，故而称为细胞骨架；
 - 对生长、分裂、分化，物质运输、能量转换、信息传递、基因表达都有重要作用。



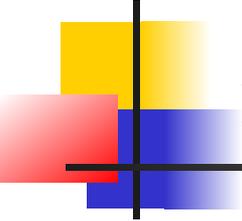
■ 实验目的：

1. 了解细胞骨架的结构特征
2. 掌握光镜标本的细胞骨架的制作方法。

实验仪器： 显微镜、盖玻片、载玻片、吸管、小烧杯、镊子

■ **试剂：** 磷酸缓冲液、1% Triton X-100、M-缓冲液、0.2% 考马斯亮蓝 R250 染液、3% 戊二醛

■ **标本：** 玉葱鳞叶



实验原理

- 细胞骨架在通常固定条件下不稳定，如低温、高压、酸处理等。
- 当采用适当的手段，如当洋葱表皮细胞用适当浓度的Tritonx——100(聚乙二醇辛基醚，是一种非离子去垢剂)处理，能溶解质膜结构中及细胞内许多蛋白质，细胞骨架系统的蛋白质却不被破坏，
- Triton X-100处理能抽取掉一部分杂蛋白，可使骨架成分显现的更加清晰。

- M-缓冲液洗涤细胞，可以提高细胞骨架的稳定性

咪唑：稳定PH值，缓冲作用。

KCL：提供离子，对骨架起聚合作用。

MgCL₂：提供离子，对骨架起聚合作用。

EGTA：螯合Ca离子 Ca离子对聚合不利。

EDTA：螯合Ca离子 Ca离子对聚合不利。

巯基乙醇：起还原作用，稳定骨架结构。

- 戊二醛在室温下固定能较好的保存细胞骨架的成分，
- 经固定，考马斯亮兰(非特异性蛋白质染料)染色后，胞质背景着色弱，有利骨架的显示，可在光镜下观察到。

操作步骤

取材（洋葱内表皮1cm²）

2mlPBS荡洗1次

2mlTritonX-100, 37℃, 水浴30min

2mlM-buffer荡洗两次

2ml戊二醛固定10min

2mlPBS荡洗1次

2-3滴2%考马斯亮蓝染色5min

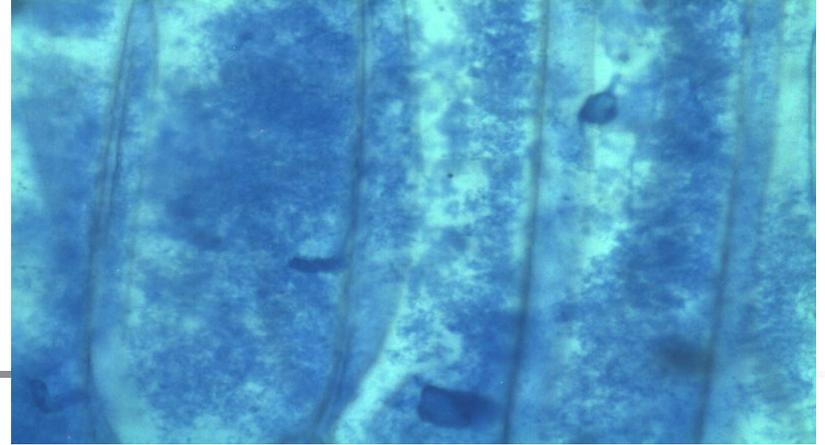
自来水荡洗

制片

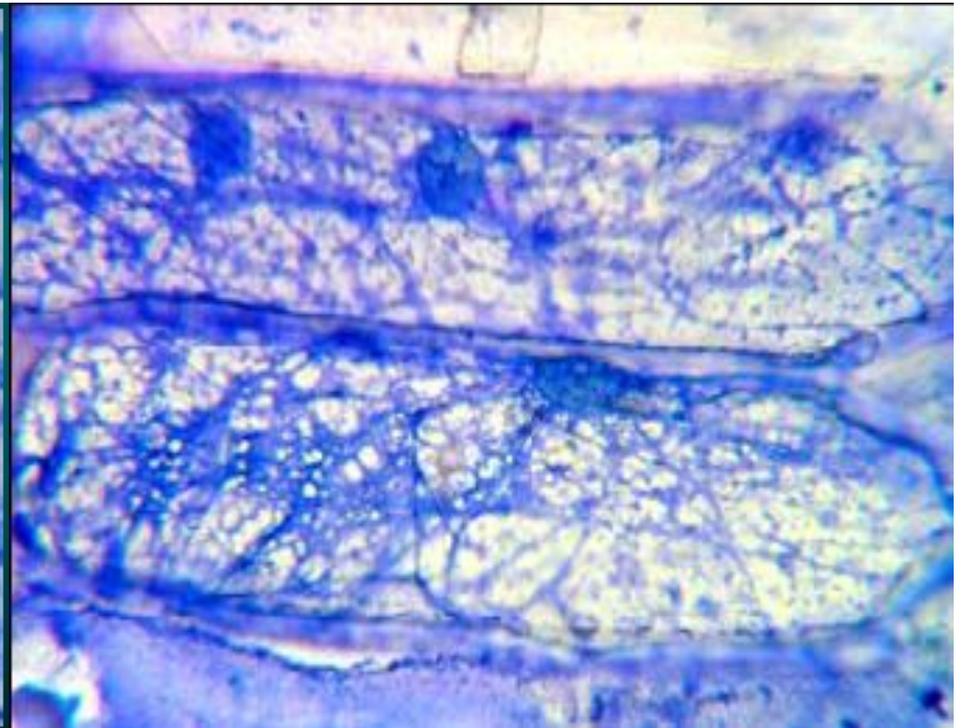
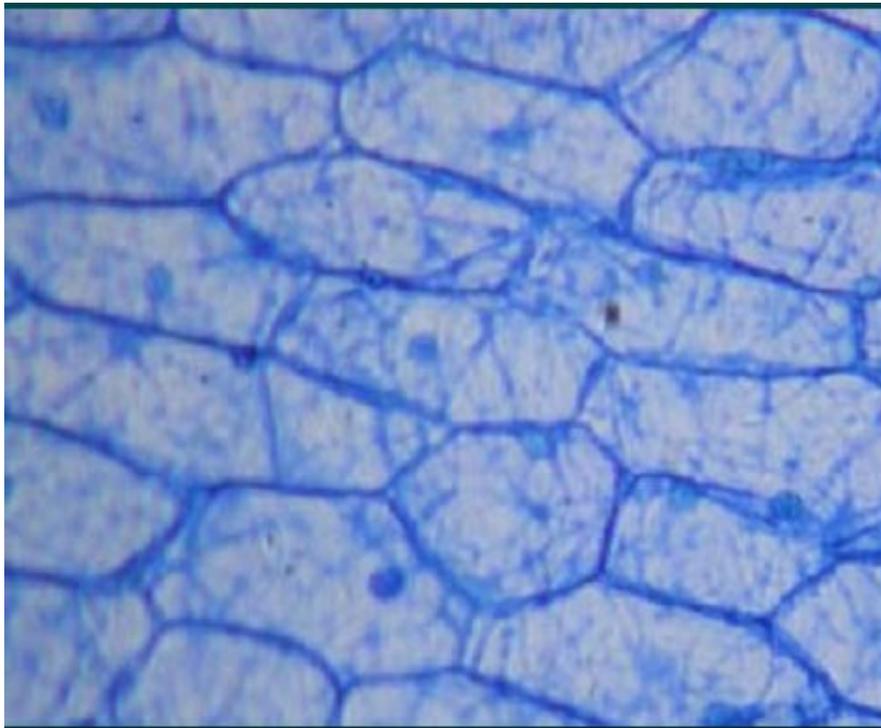
四、实验方法与步骤

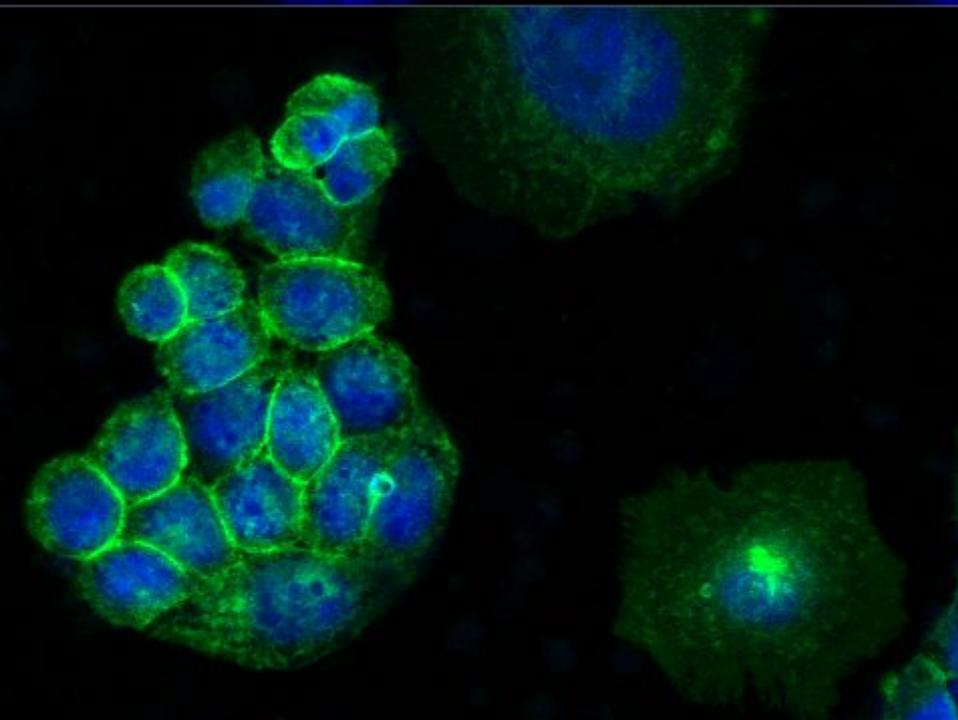
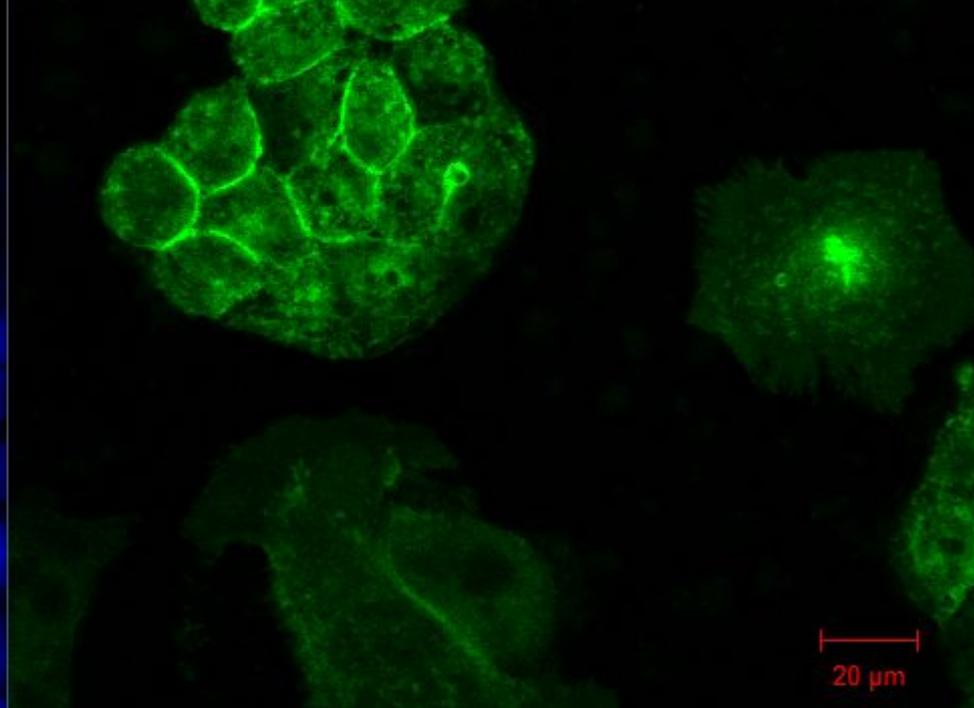
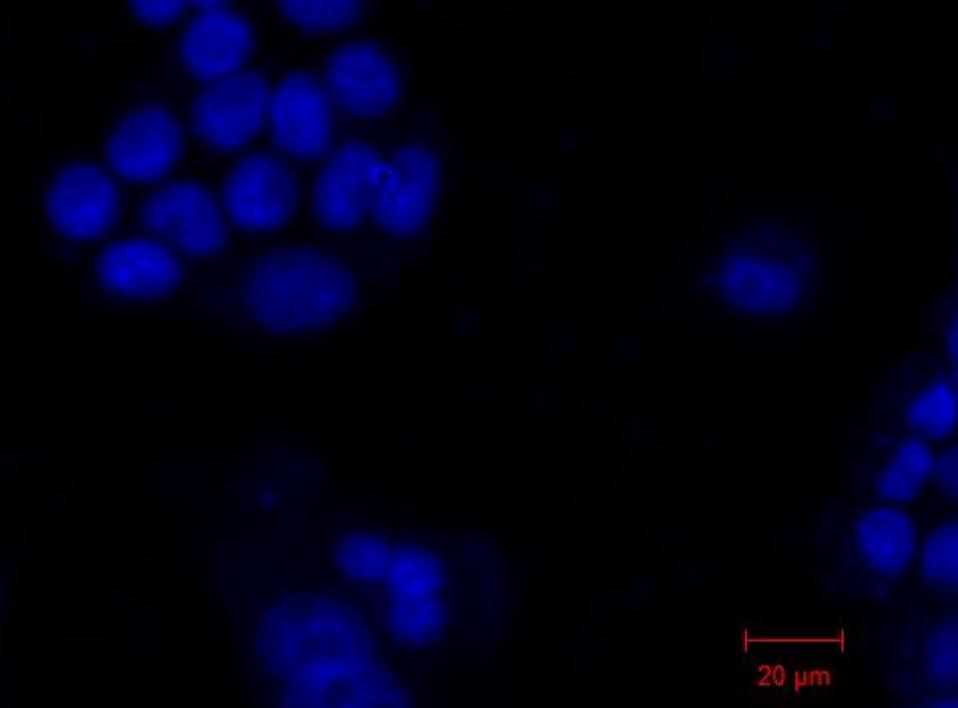
1. 撕取洋葱鳞茎内表皮 1cm^2 若干片，置于小烧杯中。
2. 用 2ml PBS (Ph6.8) 荡洗1次或浸泡5min。
3. 吸去PBS，用 2ml 1% TritonX-100水浴30min (37°C)。
4. 吸去TritonX-100，用 2ml M-缓冲液荡洗2次，3-5分钟。
5. 用 2ml 3%戊二醛固定10min。
6. 用 2ml PBS (Ph6.8) 洗1次，每次3-5min。
7. 吸去PBS，加入2-3滴考马斯亮蓝R250 染色5min。
8. 吸去染液，蒸馏水洗。
9. 置于载玻片上，盖上盖玻片，在光学显微镜下观察。

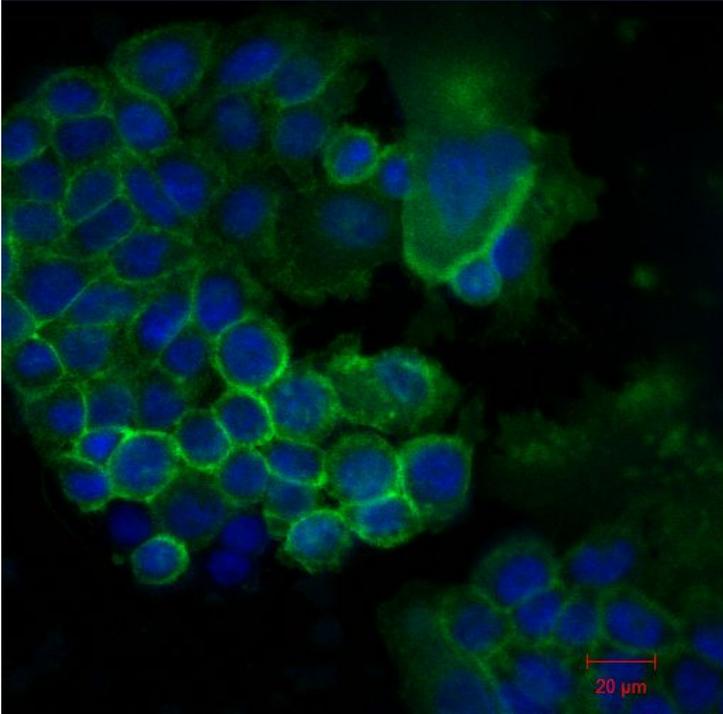
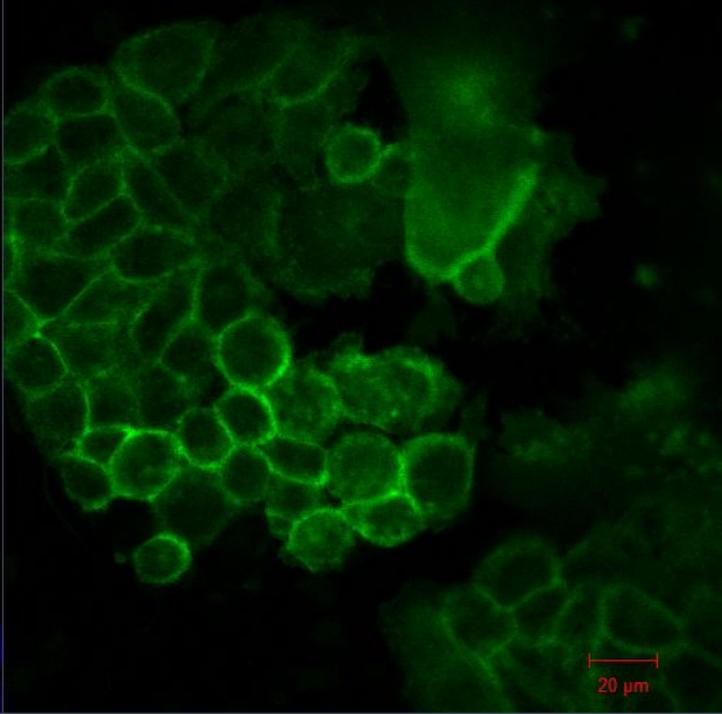
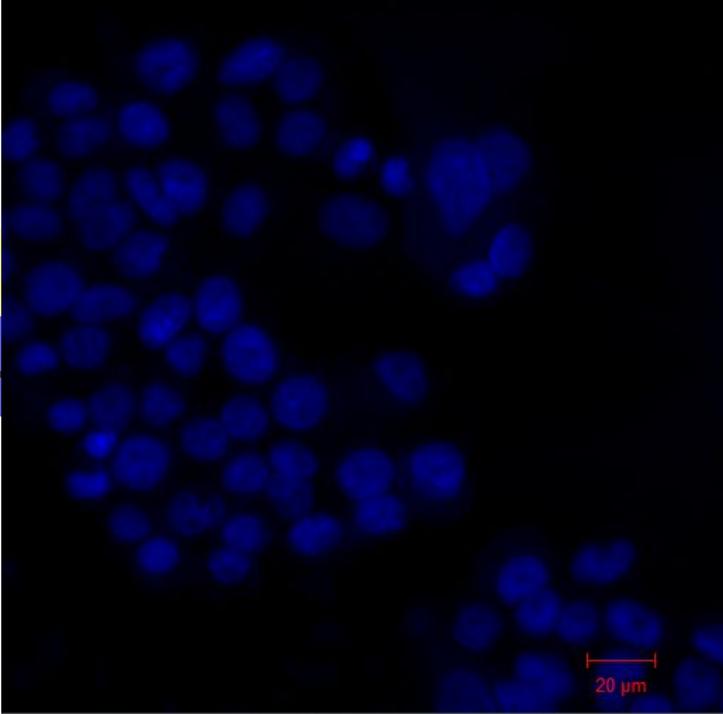
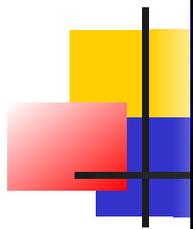
实验结果

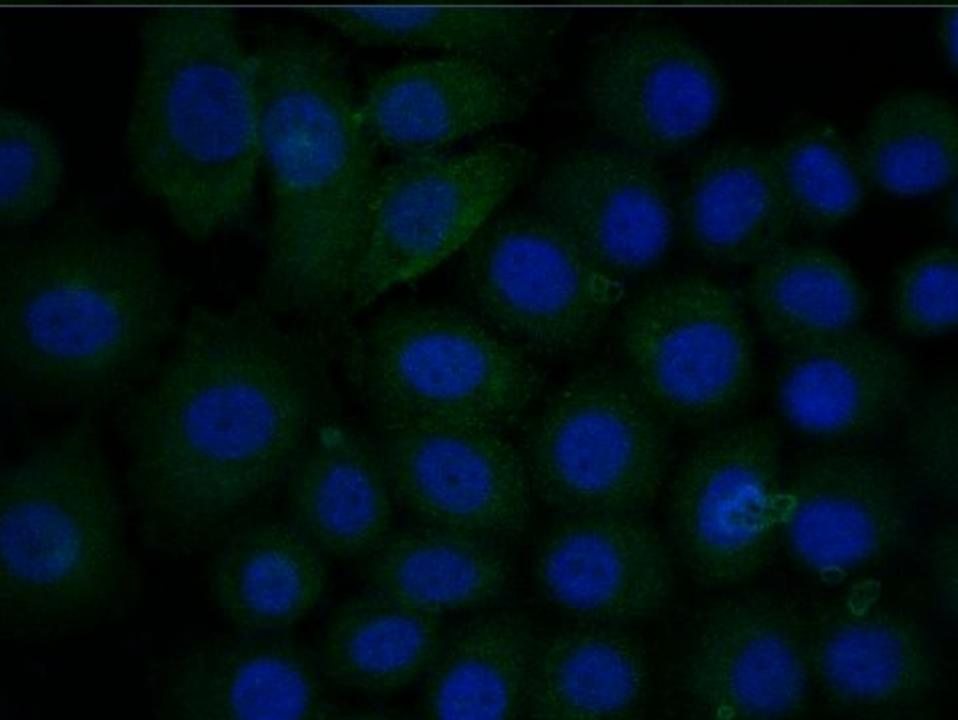
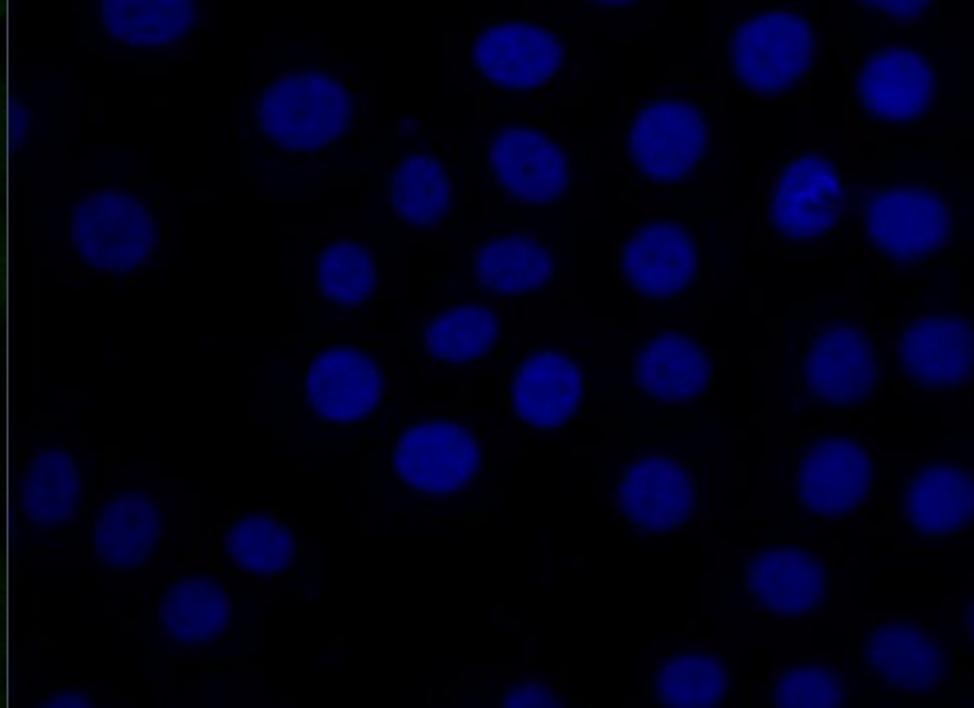
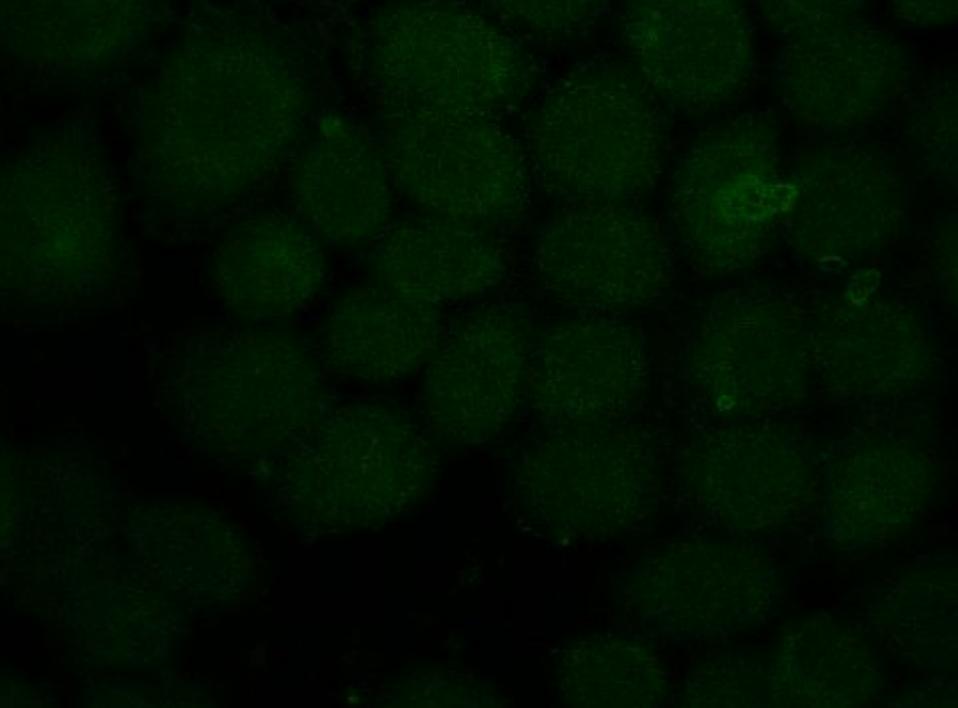


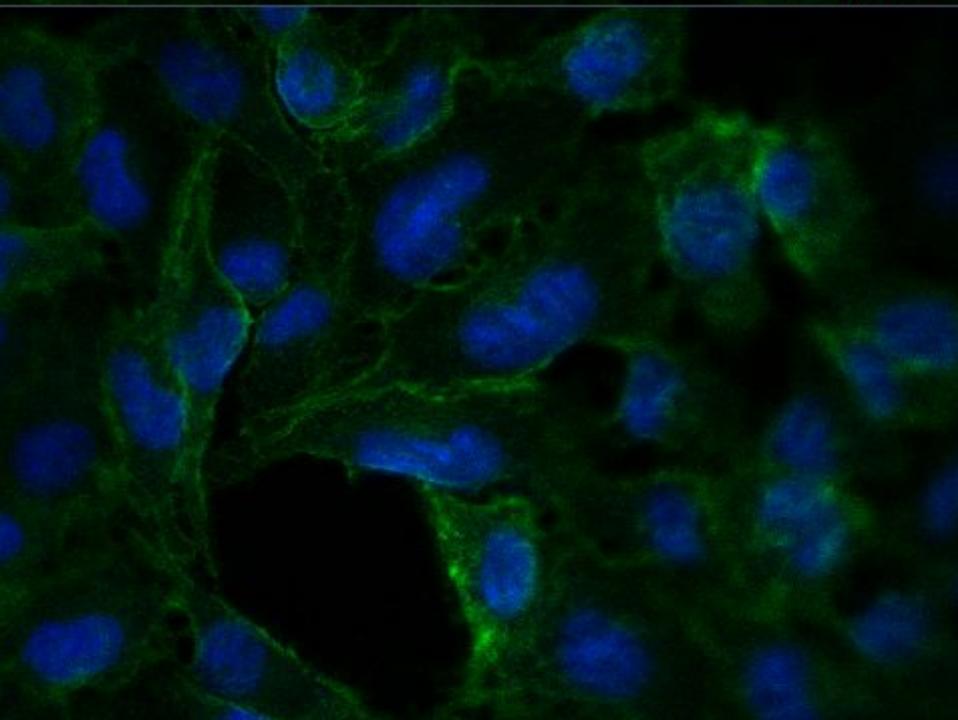
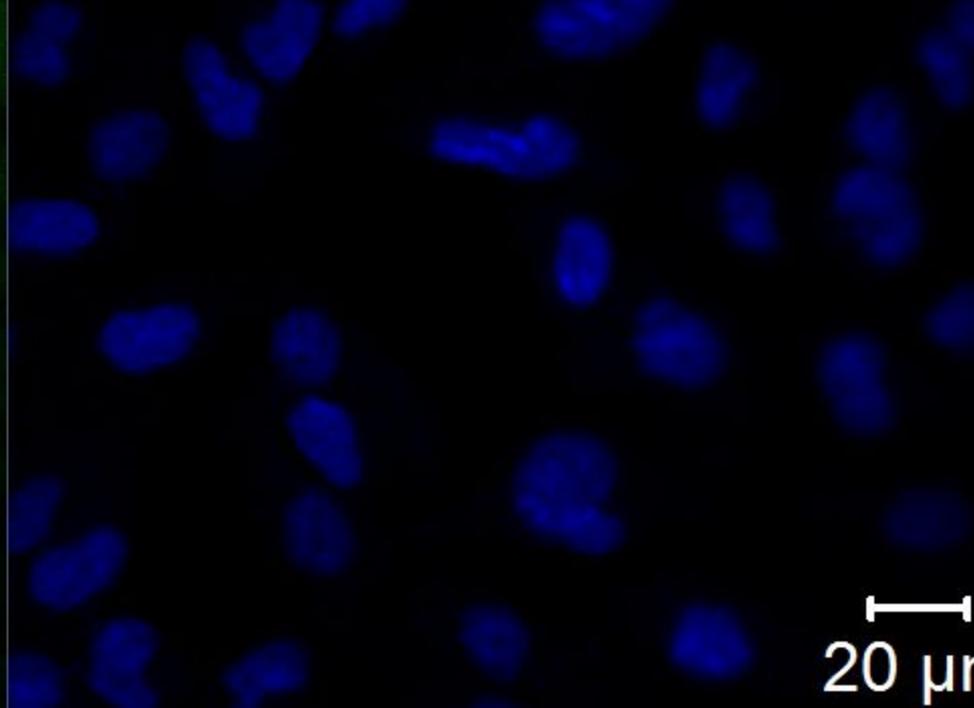
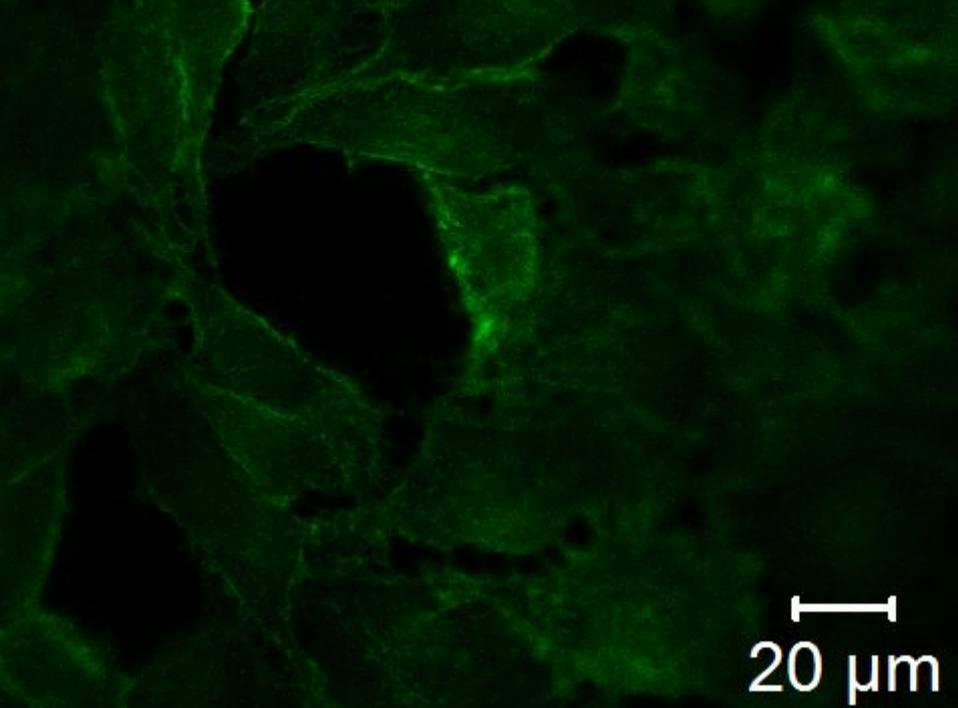
- 细胞内有蓝色、粗细不均的纤维网状结构，即为细胞骨架。











细胞生物学实验技术简介

免疫荧光染色显示细胞骨架

免疫荧光染色 (Fluorescence immuno-staining) 是利用抗原—抗体特异性结合的原理, 用经荧光染料标记的抗体对细胞或组织内的蛋白质进行定性或定量研究的方法。该技术与荧光显微镜观察相结合, 可对特定的蛋白质进行细胞或组织内的精确定位。近年来随着各种新基因和新蛋白的发现, 免疫荧光染色技术也得到越来越广泛的应用, 免疫荧光技术本身也不断得到改进。

常用于抗原、抗体标记的荧光染料有以下几种

显示绿色荧光: Fluorescein isothiocyanate (FITC), Alexa-488

显示红色荧光: Rhodamine B, Texas Red, Alexa-546, 568, 594

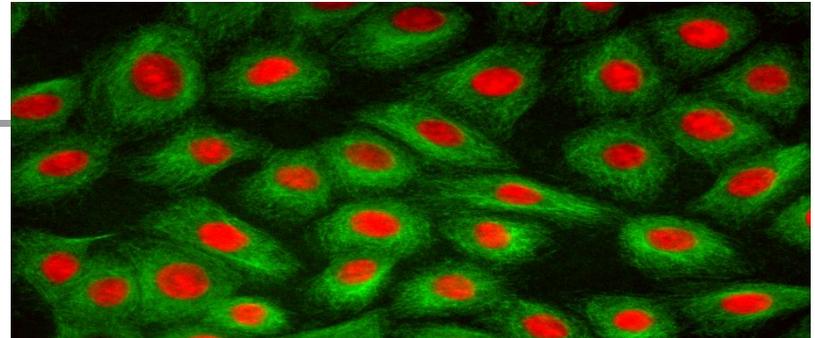
显示蓝色荧光: Alexa-350

标记抗体或抗原的荧光染料应具备下列条件:

- 1、符合显微镜滤色片对激发和发射光的波长要求;
- 2、具有化学上的活性基团, 易与蛋白结合, 且结合牢固、不易脱离;
- 3、与抗原、抗体的结合方式简便, 不影响抗原或抗体的效价;
- 4、荧光明亮、不易淬灭;
- 5、性质比较稳定, 易溶于水。

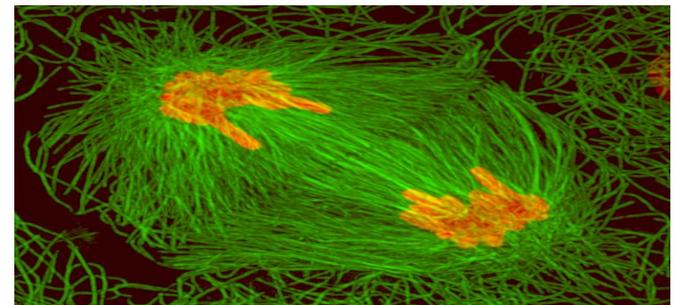
荧光免疫染色类型: 直接、间接和补体介导

人皮肤角化细胞免疫荧光染色

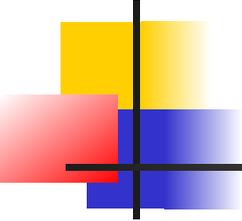


用Alexa488标记的抗人 α -tubulin抗体染色显示微管(绿色); 细胞核: 红色, DAPI染色(常规荧光显微镜照片, Shi Qinghua等)

PtK1细胞免疫荧光染色



用抗 α -tubulin抗体染色显示微管(绿色); 细胞核: 红色, DAPI染色(激光共聚焦显微镜照片)



思考题

- 1. 细胞分裂时细胞骨架发生哪些改变？
可以采取哪些研究方法进行检测？
- 2. 细胞存在微梁吗？