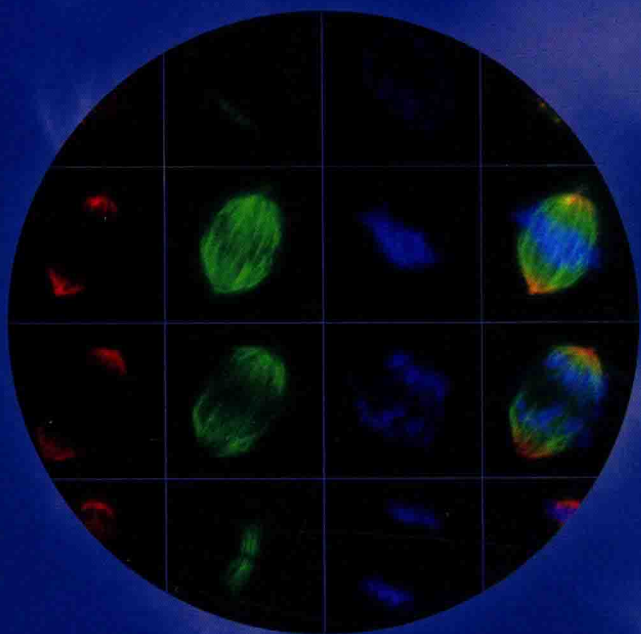


Techniques of Medical Cell Biology:
Principles and Applications

医学细胞生物学常用技术： 原理和应用

主 编 易 静
副主编 孙岳平
杨 洁



Techniques of Medical Cell Biology:
Principles and Applications

医学细胞生物学常用技术： 原理和应用

主 编 易 静

副主编 孙岳平 杨 洁

编 者
(按出现章节先后)

朱 平 杨 洁 牛 昕 李 真 易 静

杨 洁 王毓美 孙岳平 胡庆沈 黄心智

王 英 康迅雷 蔡 蓉



高等教育出版社·北京

内容简介

本教材内容分为五篇,包括观察细胞、细胞器和大分子的技术,操作细胞及其大分子的技术,分析细胞及其大分子的技术,分析细胞基本活动的综合技术和分析细胞信号转导的综合技术,重点展示了医学细胞生物学经典而常用的单元技术,以及新兴的和整合的技术,力求让读者由此领悟到各种技术的方法学原则,并通过应用实例理解其用途和用法,以促进对学生科学思维和创新能力的培养。

本教材采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质部分主要展示细胞生物学常用实验技术的基本原理、发展历史及应用举例;数字课程提供技术的基本操作过程并推介应用该技术解决科学问题的典型文献,同时附有相应课件、技术细节和自测习题供读者浏览和思考。

本书适合作为高等医学院校相关课程的本科生和研究生教材,也可供相关科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学常用技术:原理和应用/易静主编.

--北京:高等教育出版社,2017.7

ISBN 978-7-04-047146-5

I. ①医… II. ①易… III. ①医学-细胞生物学-医学院校-教材 IV. ①R329.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第013861号

策划编辑 王莉
封面设计 姜磊

责任编辑 王莉
责任印制 田甜

特约编辑 靳然

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 北京人卫印刷厂
开本 850mm×1168mm 1/16
印张 11.25
字数 270千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2017年7月第1版
印 次 2017年7月第1次印刷
定 价 32.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 47146-00

数字课程 (基础版)

医学细胞生物学 常用技术： 原理和应用

主 编 易 静

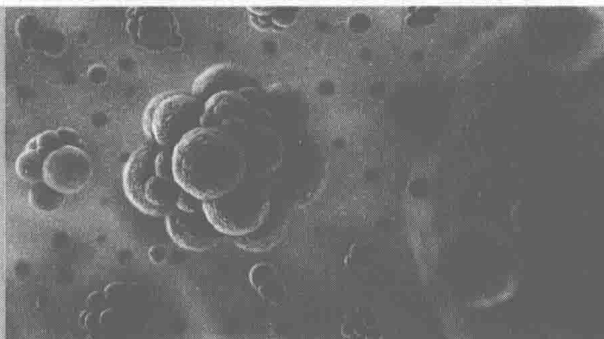
副主编 孙岳平 杨洁

登录方法：

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/47146>，或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录，进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号（20 位密码，刮开涂层可见），或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码，完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”，开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题，请发邮件至：

lifescience@pub.hep.cn



医学细胞生物学常用技术： 原理和应用

围绕《医学细胞生物学常用技术：原理和应用》纸质教材知识体系，立足于呈现更多扩展学习资源和实际应用案例，本配套数字资源涵盖了参考文献、教学课件、自测习题、方法步骤、应用举例结果图片等内容，并专门推荐了反映技术发展历史和现状的经典文献。建议教师根据教学需求遴选数字资源用于教学，学生可根据学习需求利用这些资源开阔视野进行自主学习，提升学习效果。

用户名： 密码： 验证码： **5360** 忘记密码？

<http://abook.hep.com.cn/47146>



扫描二维码，下载 Abook 应用

前言

编写本书的目的是为医学院校的两类人群——医学生以及研究生或研究人员——概要地展示医学细胞生物学实验技术，其中既包括那些经典而依然常用的单元技术，也包括新兴的和整合的技术。我们不是想要提供一份操作手册般可供直接使用的技术步骤指导，而是启发读者思考：人们在面对未知科学问题时是怎样创造和设计了各种基于细胞的技术手段的；选用什么技术可以解决实际问题；为什么这样选；大致上怎么做？

为什么细胞生物学实验技术与医学相关

细胞生物学是研究细胞基本生命活动规律的科学，因此必然与医学有着密切的联系。有趣的是，研究细胞的方法和技术从诞生伊始就与医学密切相关。三个多世纪以前，英国物理学家 R. Hooke 在 1665 年出版了《显微图谱》一书，描述了他用自己制作的光学显微镜（透镜组合）观察到木栓切片时发现的蜂窝状小孔结构，他把这种小孔称为“cell”（小室）。显然，他看到的“cell”实际上是由植物细胞壁所围成的空腔，因此他当时并没有发现真正的细胞，只是提出了“cell”这个名词。真正发现细胞的是同时代的荷兰科学家 A. Leeuwenhoek，他在 1674 年用自制的光学显微镜观察到池塘水滴中的原生动物细胞，并在其后的观察中发现了哺乳动物和人类的精子、鲑鱼红细胞的细胞核、牙垢中的细菌等。毫无疑问，这些发现必然导致 Leeuwenhoek 及其同时代的人们思考那些畸形的精子和牙垢中的细菌与人类的生殖和口腔疾病的关联。

19 世纪细胞学说的建立和细胞病理学的形成，使人们对人体和疾病的认识进入细胞水平，从而为现代医学的发展奠定了基础。医院里所有活检和手术标本都要接受显微镜检查（病理学检查）的程序沿用至今，其观察结果一直是疾病诊断最重要的依据之一，同时成为人类认识疾病发生和发展过程的知识来源。20 世纪细胞生物学和分子生物学的发展，进一步使医学研究深入到分子水平，对人体和疾病的认识也上升到更加本质的层次。例如，一些疾病的病理诊断依赖电子显微镜、免疫组织化学、流式细胞术、聚合酶链反应（PCR）等技术，这些都属于分子细胞生物学技术。从研究疾病的角度讲，现代医院，特别是研究型大学附属的教学医院（被称为学术型医院“academic hospital”），普遍成立了各种实验室和研究所，对各科疾病进行机制和防治的研究，其基本手段不可避免地包括细胞生物学技术，例如细胞培养、基因表达和功能分析等。甚至，细胞生物学技术已经用于人类疾病的治疗，这方面突出的例子是人体器官和组织的修复和再造中采用的组织工程（tissue engineering）技术和干细胞技术，如将源于自体的干细胞诱导分化并与材料整合移植到体内，修补皮肤、软骨、骨和肌腱等，这类技术的基础是细胞培养和细胞工程，用以实现对体外生物材料上以及移植入体内后细胞的增殖、分化和死亡进行干预。

谁需要学习医学细胞生物学实验技术

由上可见,细胞生物学的知识和技术不仅为疾病诊断提供了新的手段,而且为疾病的治疗开辟了新的途径。因此,生物医学行业的各种人群都需要在不同程度上了解细胞生物学的技术和实验方法。

医学生在学习医学和生物学基础课程的时候,适当了解医学细胞生物学的技术,将极大地有利于日后对疾病的病因学、病理学、诊断学和治疗学的相关课程学习。例如,正常细胞恶变为肿瘤细胞的一个基本形态学特征是细胞变大、核质比增大,这在医学生后期学习的病理学和临床检验学中都是一个重要的知识点,究其原因,就需要前期从正常和恶性细胞的基本形态学和细胞化学开始认识,所用的分析手段也是前后期共通的。

对于那些有兴趣发现临床现象中的基本科学问题、有志于成为学术型医生的医学生和青年医生,了解医学细胞生物学的技术如何解决科学问题,将会激发他们的学术兴趣和研究热情——要知道历史上有多位诺贝尔生理学或医学奖甚至于化学奖的得主都是医生出身,他们是在医疗实践的同时进行基础研究并获得重大发现的。例如因发现细胞膜上的水通道而荣获2003年诺贝尔化学奖的Peter Agre就是一位血液病医生,他在多年研究溶血性疾病的过程中注意到,红细胞匀浆进行电泳时有一条含量丰富的未知蛋白质条带,最后他用基因转染等技术阐明就是这种膜蛋白(被命名为“水孔蛋白”)介导了水的快速流入和流出,从而造成红细胞在低渗环境中的膨胀和高渗环境中的皱缩,解释了一个长期以来众所周知却又不明原因的现象。

对于生物医学行业的研究生来说,医学细胞生物学的技术则是各种实验室必须拥有的基本技术。后基因组时代的生物医学研究都是以细胞为基础进行的,基因功能的研究内容离不开对基因表达产物蛋白质在细胞内的定位、调控和相互作用的关注。因此细胞生物学是理解当今生命科学各学科知识的基础,医学细胞生物学技术也是各种实验室技术的基础组成部分。例如,一个临床肿瘤研究小组致力于探索某个新发现的蛋白质是否可能成为肿瘤早期标志物,从而帮助临床前普查或临床分类,这通常是肿瘤学研究最主要的一项内容。为了知道答案,研究人员首先必须思考并逐步弄清这种蛋白质位于细胞内何处,如果这是一种分泌型蛋白质,就很容易从血液中检测到,从而使它可能成为敏感性很高的早期指标,而通过运用细胞生物学技术中的细胞化学技术,便可以简单明了地获得所需要的信息。

最后,从普遍的实用性出发,对于所有初入门的年轻学生和研究者来说,在接触生命科学各个研究领域的学术文献和学术报告时,了解细胞生物学技术的基本原理,初步知道如何解读(interpret)常见实验的数据,将对他们理解文献和报告提供极大的帮助,从而令他们在步入科学的神圣殿堂之际减少一分茫然,增加几分好奇。

如何学习细胞生物学实验技术

当代生命科学的发展是与细胞生物学实验技术的进步密切相关的,而细胞生物学的每一个重大进展更是依赖于引入新的研究技术。光学显微镜的发明开创了细胞学,电子显微镜的出现使人们对细胞结构的认识深入到超微结构水平。细胞化学和分析细胞学技术可对细胞的各种成分进行定位和定量的分析,有利于细胞结构与功能的研究。细胞培养技术可使细胞在体外环境中生长,让人们在体外研究细胞的结构、功能和生命活动规律,而细胞工程技术则可人为地将细胞进行改造,以获得

具有特定生物学特性的细胞。近 20 年来分子生物学技术的广泛应用，更有力地推动了细胞生物学的发展。细胞生物学技术种类很多，包括物理技术、化学技术和实验生物学技术等，本书仅对基本的、常用的和新近出现的重要的细胞生物学技术进行介绍，包括数种对细胞、细胞器和大分子进行观察、分析和操作的基本技术和方法。对于在细胞生物学研究中广泛应用的分子生物学技术则不作重点介绍。

需要强调的是，任何一项成功的生物医学研究一般都需要综合运用多种细胞生物学技术，并结合生物化学、分子生物学、遗传学、模式生物学等其他技术。而且，新的技术及其涉及的试剂和仪器也在不断地产生和发展，需要研究人员基于对基本技术的原理的了解，对所应用的技术进行恰当的选择。

对于本书的基本读者群之一的医学生，本书希望呈现的与其说是林林总总的技术细节，不如说是科学家在解决细胞生物学问题时所采用的整体策略；作为实验教材要求医学生深入学习和实地操练的只是其中个别技术，试图起到举一反三促进理解和培养动手能力的作用。

对于另一基本读者群——医学院校的研究生和研究人员，我们希望更加注重方法学的策略意义和创造性。当然，用作教材时，研究生可以深入学习甚至操练的技术种类要比医学生多得多，同时此书也可以成为他们的常用技术参考书，其特点是系统性和新颖性。

鉴于新的技术方法及其涉及的试剂和仪器不断在产生和发展，每一种商品化的试剂和仪器都会有制造商提供的操作步骤（protocol）作为说明，而科学文献所报道的研究结果都会附以详尽的、可跟随的材料与方法（materials and methods）介绍。再者，成熟的实验室也都会有自己独特的习惯性的技术操作方法，任何读者都几乎不会需要跟随一本教科书进行实验操作。为此，本书在介绍各种技术时，把重点放在原理和应用上，而不是对操作步骤作系统的和细节上的介绍，力求让读者由此领悟到各种技术的方法学原则，并通过应用实例理解其用途和用法。

本书的编写方式和特点

本书分为五篇共十六章，每一章介绍一种技术，根据技术的主要功效，把它们归纳到相应的篇。例如，第一篇的第一章介绍显微镜技术，这是经典的观察细胞和细胞器的技术；显微镜附以细胞化学反应，可以将细胞的化学成分特别是生物大分子的位置和含量在显微镜下呈现出来，因此，细胞化学技术可以被看作是“观察大分子的技术”，放在第二章。这样，第一篇就介绍“观察细胞、细胞器和大分子的技术”。又如，第三篇介绍“分析细胞及其大分子的技术”，其中第六章介绍流式细胞术，这种技术的基础虽然也是细胞化学技术，但是由于其突出的、强大的定量分析功效，被归于第三篇。各篇的划分所依据的是技术的主要功效，是相对人为的。

需要指出，第一篇至第三篇所介绍的是经典而相对单一的技术，而第四篇和第五篇所介绍的技术往往采用了前面的单一技术，是运用多种手段的综合技术，如第五篇“分析细胞信号转导的综合技术”包含了基因转染（属于细胞工程技术）、免疫荧光蛋白定位（属于细胞化学技术）、蛋白质定量分析（属于免疫印迹技术）等。

本书对每一种技术都举例说明其应用的功效和所要解决的科学问题，这将使读者更容易理解这些技术的适用情境和用法。当然，需要说明，为了使图文引用更为便利，应用举例主要为编者所在团队的工作。

本书的编写者都是多年从事医学细胞生物学研究和教学工作的中青年教师，每一位都具备相关

技术的操作能力和个人经验，所举例子大多为本人或本实验室的工作，体现出实用性和适用性。

综上所述，本书致力于避免枯燥地罗列技术种类和过于繁琐地展示技术细节，希望读者从参考阅读中得到对于技术原理和应用的理解，并培养科学思维和综合应用技术的能力，即能够认识到“选用什么技术解决什么问题”“为什么这样选”和“大致上怎么做”。针对将本书作为教材的使用需要，我们对可能开设的实验课内容也作了一些提示。

另外，本书将纸质教材与数字化资源进行一体化设计，形成“纸质教材+数字课程”的新形态教材体系。纸质教材突出知识内容主线，而数字课程（在书中用“e”提示，读者可登陆相关网站进行在线学习）则对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，呈现出丰富多样的多媒体资源，有利于学生自主学习。

本书的编写离不开上海交通大学医学院长期使用的内部教材和相应的教学实践。在此向为原教材编写作出贡献的前辈和同事，特别是汤雪明教授，表示深切的感谢。

易 静

2016年12月

目 录

第一篇 观察细胞、细胞器和大分子的技术

第一章 显微镜技术····· 003

第一节 光学显微镜····· 005

第二节 激光扫描共聚焦显微镜····· 008

第三节 超高分辨率荧光显微镜技术····· 011

第四节 活细胞荧光工作站····· 014

第五节 电子显微镜····· 016

第六节 原子力显微镜····· 020

第二章 细胞化学技术····· 023

第一节 酶细胞化学技术····· 025

第二节 免疫细胞化学技术····· 027

第三节 原位杂交技术····· 031

第二篇 操作细胞及其大分子的技术

第三章 细胞结构成分的离心分离技术····· 037

第一节 差速离心法····· 040

第二节 密度梯度离心法····· 042

第四章 细胞培养技术····· 045

第五章 细胞工程技术····· 052

第一节 细胞融合技术····· 053

第二节 核酸分子导入细胞的技术····· 054

第三篇 分析细胞及其大分子的技术

第六章 流式细胞术····· 063

第一节 分析式流式细胞术····· 064

第二节 分选式流式细胞术····· 075

第七章 组织和细胞显微图像分析技术····· 078

第一节 组织和细胞几何参数的分析····· 080

第二节 荧光和染色的信号强度和阳性
面积分析····· 080

第八章 定量分析 mRNA 的技术····· 083

第一节 RT-PCR 技术····· 084

第二节 real-time PCR 技术····· 087

第九章 分析蛋白质的技术····· 093

第一节 免疫印迹····· 094

第二节 免疫共沉淀····· 097

第三节 荧光共振能量转移 (FRET) 技术·· 100

第四篇 分析细胞基本活动的综合技术

第十章 检测细胞增殖····· 109

第一节 MTT 法和 CCK8 法····· 109

第二节 BrdU 参入法····· 111

第三节 细胞周期分析····· 113

第十一章 检测细胞衰老和死亡····· 116

第一节 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色·· 117

第二节 Annexin V 标记····· 118

第三节 TUNEL 标记····· 120

第十二章 检测细胞自噬····· 123

第一节 自噬过程和水平的电镜分析·····	124	第一节 野生型、截短体或突变体基因的 强制过度表达·····	156
第二节 LC3-II 水平和 LC3 点状 定位的检测·····	127	第二节 基因沉默和敲除·····	160
第三节 自噬流的评估·····	130		
第十三章 检测细胞黏附和迁移·····	134	第十六章 分析蛋白质相互作用来验证 蛋白质的功能和上下游关系·····	164
第一节 细胞 - 基质黏附实验·····	134	第一节 基因表达干预下的免疫 共沉淀分析·····	164
第二节 Transwell 实验·····	136	第二节 基因表达干预下的蛋白质 定位和相互作用分析·····	166
第三节 划痕实验·····	137		
第五篇 分析细胞信号转导的综合技术		附录 综合实验: 分析 A 基因对肿瘤细胞 凋亡耐受的影响 ⑥	
第十四章 分析蛋白质修饰和活性·····	143	实验一 肿瘤细胞的传代培养	
第一节 分析蛋白质修饰的方法 (以磷 酸化和 SUMO 化修饰为例)·····	143	实验二 pEGFP-A 基因表达质粒的转染	
第二节 分析酶活性的方法 (以激酶和 SUMO 蛋白酶为例)·····	147	实验三 转染细胞的荧光显微镜观察	
第三节 分析转录因子活性的方法·····	150	实验四 转染细胞的活力检测	
第十五章 干预基因的表达和功能·····	156	实验五 流式细胞仪检测细胞凋亡	

第一篇

观察细胞、细胞器和大分子的技术

第一章 显微镜技术

- 光学显微镜
- 激光扫描共聚焦显微镜
- 超高分辨率荧光显微镜技术
- 活细胞荧光工作站
- 电子显微镜
- 原子力显微镜

第二章 细胞化学技术

- 酶细胞化学技术
- 免疫细胞化学技术
- 原位杂交技术

人类凭借原始的显微镜认识到细胞的存在和它们的基本形态以及特性，细胞学说得以诞生。在认识到细胞是所有有机体的结构和功能单位以后，人们对细胞的结构、化学成分和功能进行了不断的探究。一方面依赖分辨率逐步提高的各种显微镜和相应的样品制备技术，我们可以在显微和亚显微的层次观察细胞结构，另一方面依赖染色，即各种细胞化学技术对细胞化学成分特别是核酸和蛋白质等生物大分子进行标记，我们能够在显微镜下观察到分子的存在、位置、含量和它们与其他分子的相互关系。我们观察的细胞可以是离体的培养细胞，也可以是位于体内原位组织细胞。当我们观察在各种生理或病理条件下的细胞以及其中被标记显示的大分子时，我们可以看到生物大分子分布于细胞、组织和机体的美妙图像，也可以对大分子与细胞、组织和机体内环境之间复杂的相互影响形成具象的认识。毫无疑问，观察到细胞结构的更多细节以及大分子与细胞、组织的交互调控，有助于我们更好地理解人体和生命。

本篇包含的两章介绍了显微镜技术和细胞化学技术，概要地展示了人们认识细胞及其大分子的技术与其发展历程。因为细胞的发现始于显微镜，我们首先在第一章逐一介绍不同分辨能力和不同应用侧重的各种显微镜技术。需要指出，显微镜技术不仅包含显微镜仪器设备，还包含了相应的样品制备技术。在叙述显微镜光学原理的同时，我们也要关注被观察的样品的特点以及制备中的关键要点，这样才能更好地理解显微镜技术进步的特征，懂得在研究中恰当地选用显微镜，并能够优化仪器设置参数和样品制备方法。细胞化学技术泛指让细胞的化学成分得到标记从而在显微镜下可见的技术，本篇第二章主要介绍了显示酶、蛋白质以及核酸的技术。这类技术的关键在于观察细胞的显微结构、亚显微结构的同时观察生物大分子的定位。因此，样品制备技术的核心是兼顾组织细胞形态结构的保存和大分子活性的保存。显微镜技术和细胞化学技术都是古老的技术，然而免疫电镜技术和超高分辨率显微镜技术的诞生显示了这两方面技术的日益精进和完美结合可以带来技术水平的巨大变革，也预示这两类技术仍有很大的发展空间。

显微镜技术

显微镜技术 (microscopy) 是细胞学和细胞生物学得以建立和发展的重要工具, 主要包括光学显微镜、电子显微镜等若干层次的显微镜 (microscope), 以及相应的样品制备和信号呈现技术, 是人们观察细胞、细胞器和细胞内大分子的关键技术。

人类最初只能用肉眼直接观察周围世界, 可是人眼观察事物的能力是有限的, 一般情况下在 25 cm 的明视距离内, 只能分辨相距 0.1 ~ 0.2 mm 的两个物体, 如果小于这一距离, 人眼就不能分辨。17 世纪英国人 Hooke 和荷兰人 Leeuwenhoek 分别利用玻璃透镜片组合而成的原始光学显微镜发现了动植物的细胞以及许多微生物, 观察到了它们的微细结构, 从而导致细胞学的诞生, 人类从此开始了对生物体微观世界的研究。随着显微镜衍生出多种类型, 人类观察细胞的能力不断提升。各种显微镜的技术优化核心是提高分辨率, 这体现在两个方面, 一是不同光源的采用, 二是各种样品制备和信号呈现方法所带来的形态结构反差和信号噪声比 (信噪比) 的提高。但是**光学显微镜** (light microscope 或 optical microscope, LM) 的分辨率极限为 0.2 μm , 也就是说不能分辨出距离小于 0.2 μm 的两个点, 这是因为可见光的衍射特性和波长的限制。这一理论是由 Ernst Abbe 于 1873 年建立的, 即, 由于光波的衍射特性, 基于透镜 (len) 的光学装置无法分辨距离小于光波波长一半的两个点, 这一著名的“阿贝定律”指出了光学显微镜的衍射极限 (diffraction limit)。

分辨率 (resolution) 是指能区分两个质点间的最小距离。对于任何显微镜来说, 分辨率都是最重要的性能参数 (图 1-1)。光学显微镜的分辨率与光波波长、物镜数值孔径有关, 可用阿贝公式表示为:

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \times \sin\theta}$$

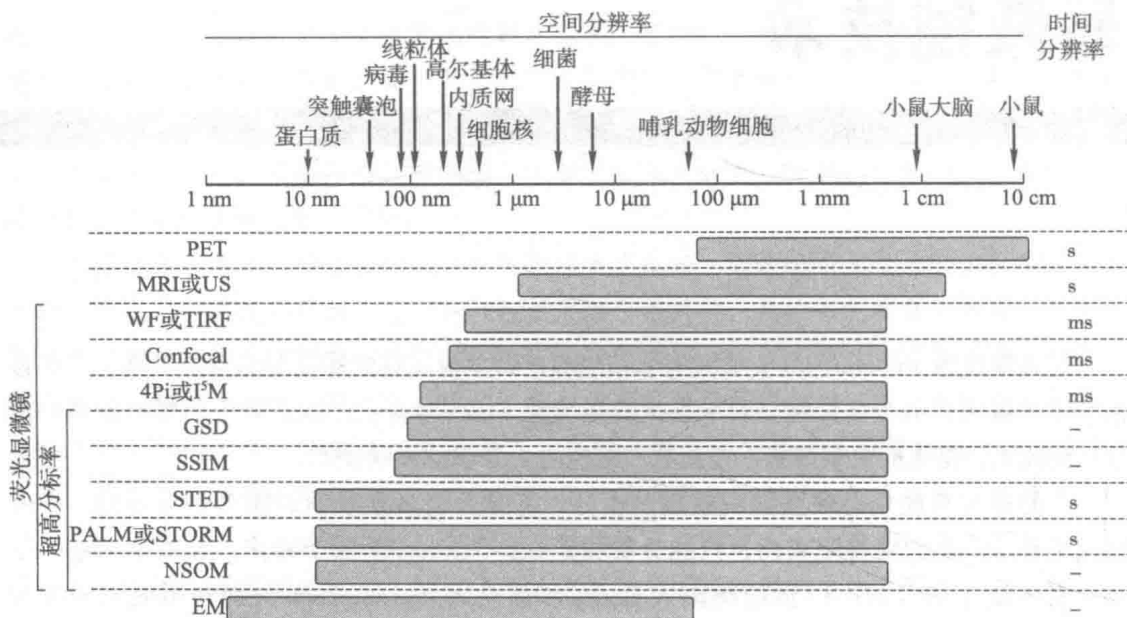
式中, d 为分辨率, λ 为光波波长 (可见光波长为 390 ~ 780 nm), n 为物镜与物体间介质的

折射率(空气为1,油为1.5), θ 为光束进入物镜的半角, $\sin\theta$ 小于1。以 $\lambda=0.5\ \mu\text{m}$, $n=1.5$, $\sin\theta$ 的极值1代入公式:

$$d=0.61\times 0.5\ \mu\text{m}/1.5=0.2\ \mu\text{m}$$

因此在光学显微镜中, λ 越短,分辨率越高; n 和 θ 越大,分辨率也越高。 $n\times\sin\theta$ 简称N.A,即数值孔径,物镜上一般都标有N.A值,N.A值越大,分辨率越高。

从上述计算中我们可以看出,光学显微镜分辨率受到光波波长的限制,大约等于所用光源的半波长。这是由于光波具有衍射现象,当光波波长大于物体直径的2倍时,光波能绕过物体前进,就像没有遇到物体一样,所以在光学显微镜下看不清直径小于波长一半的物体。当物体直径小于200 nm(0.2 μm)时就分辨不清。



PET—正电子发射断层扫描技术;MRI—磁共振成像;US—超声成像;WF—宽视野成像;TIRF—全内角反射荧光术;Confocal—共聚焦扫描显微镜;4Pi或I³M—干涉成像显微镜4Pi或I³M;GSD—基态损耗显微镜;SSIM—饱和结构照明显微镜;STED—受激发射损耗显微镜;PALM—光敏定位显微镜;STORM—随机光学重建显微镜;NSOM—近场光学显微镜;EM—电子显微镜。

图 1-1 各种生物影像技术的空间和时间分辨率比较(引自 Fernández-Suárez et al. 2008)

20世纪30年代,德国的Ruska发明了电子显微镜。电子显微镜(electron microscope, EM)突破了光学显微镜的衍射极限带来的分辨率极值,其分辨率最高可达2 nm左右,使人们对于细胞结构的认识逐步深入到超微观世界。20世纪80年代,IBM苏黎世实验室的Binning等人发明了扫描隧道显微镜,可直接观察DNA、RNA等生物大分子及生物膜等结构。电子显微镜采用波长短的电子射线作为照明源,电子射线的波长约为可见光波长的十万分之一,约等于0.005 3 nm,但由于电子透镜相差的存在,限制了电子显微镜的分辨率。目前电子显微镜的极限分辨率为0.2 nm左右,比光学显微镜极限分辨率提高了约1 000倍,比人眼分辨率提高了100万倍左右。

扫描探针显微镜的制作原理与光学显微镜和电子显微镜完全不同,如扫描隧道显微镜是利用量子力学中的隧道效应原理制作成的,是目前分辨率最高的一类显微镜,其侧向分

分辨率可达 0.1 ~ 0.2 nm, 纵向分辨率可达 0.01 nm。

20 世纪 80—90 年代, 激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 得到普及。这种显微镜依赖荧光来反映组织细胞、亚细胞结构和大分子, 适用于多重荧光标记和活细胞甚至活体动物观测, 大大拓展了显微镜的应用。相比于荧光显微镜, 激光扫描共聚焦显微镜的分辨率提高了 1.4 倍; 相比于电子显微镜, 它又有适合多重标记和活细胞观察的优点, 因此是目前应用最广泛的显微镜。

20 世纪 90 年代到 21 世纪初, 由于物理、化学等方面的理论研究和计算机数字处理技术的发展, 加上荧光探针的种类开发和性能优化, 显微技术领域诞生了原理各异的多种超高分辨率荧光显微镜 (super-resolution fluorescent microscope), 突破了光学显微镜的衍射极限, 可达到 100 nm 甚至 10 nm, 平均 50 nm 的分辨率, 为细胞生物学和生命科学研究带来了革命性的变化。与激光扫描共聚焦显微镜相比, 超高分辨率荧光显微镜不仅提供了更高的空间分辨率, 显示出更多的形态结构细节, 图像更加清晰, 信号噪声比更高, 有更精准的三维立体信息, 而且还提供了更高的时间分辨率, 可以更加准确地显示活细胞中信号的动态变化。相比于电子显微镜显示特异大分子的免疫胶体金标记技术, 超高分辨率荧光显微镜呈现荧光信号, 标记容易, 样品制备也较简单, 信号噪声比高, 可多重标记, 图像清晰, 具有突出的优点。

相较于大多数显微镜对固定、制片的样品的观察, 活细胞显微成像技术对活细胞样品的观察研究能动态地了解细胞及其大分子的活动, 让人们细胞乃至机体的活动产生更真实的认识。活细胞工作站 (live cell imaging system) 是该技术的主要仪器, 能在体外模拟体内环境条件, 进行显微成像采集和定时拍摄, 在白光或荧光下观测活细胞的增殖、迁移、黏附等, 并进行细胞成像分析。

◎ 经典文献 1-1

第一节 光学显微镜

光学显微镜是以可见光为光源、利用一系列镜片对细小物体进行放大的装置。用光学显微镜和相应的样品制备方法制备样品并对其进行观察的技术被称为光学显微镜技术 (light microscopy)。光学显微镜技术是研究细胞结构最重要的工具, 是导致细胞被发现的古老技术, 也是在当今细胞生物学领域中仍然应用得最为广泛的技术之一。近年来, 随着多种现代生物学技术与光学显微镜技术的结合, 光学显微镜展示出新的活力。目前光学显微镜已发展出多种类型, 能用于各类不同的研究目的。在细胞生物学中常用的有普通光学显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜, 以及暗视野显微镜和微分干涉相差显微镜等。活细胞工作站用于观察活细胞及其大分子在体外培养甚至活体动物内的活动。近年飞速发展的超高分辨率荧光显微镜, 将光学显微镜分辨率提高到前所未有的程度, 突破了光波衍射带来的分辨率极限, 成为观察大分子的强大武器。

【原理】

本节简介几种简便常用的生物用光学显微镜的原理。激光扫描共聚焦显微镜、超高分

分辨率荧光显微镜和活细胞荧光工作站将另作专门介绍。

一、普通光学显微镜

普通光学显微镜（简称为“光镜”）是最常用的显微镜，主要由3部分组成：聚光镜、物镜和目镜。光镜采用可见光作为光源，分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$ ，放大倍数为1 000倍，其他几种显微镜都是在此基础上发展起来的。

由于光镜的成像原理需要光束穿透被观察的样品，用于普通光镜的生物样品必须经过一系列的组织处理并制成 $1\sim 10\ \mu\text{m}$ 的切片。常规的样品制备方法包括甲醛固定、乙醇脱水、石蜡包埋或冰冻切片、苏木精（hematoxylin）-伊红（eosin）染色（简称HE染色）。

普通光学显微镜能观察染色的生物标本的结构，主要是因为光线通过染色标本时其颜色（光波的波长）和亮度（光波的振幅）发生变化能被人眼观察到。

二、荧光显微镜

荧光显微镜（fluorescent microscope）是以各种特定波长光源激发生物标本中的荧光物质，产生各种可见颜色荧光的一种显微镜。荧光显微镜一般采用高压汞灯和弧光灯作为光源，在光源和反光镜之间放一组滤色片以产生特定波长的激发光，光谱一般从紫外到红外，从而激发各种荧光物质产生不同波长的发射光。利用荧光显微镜可研究荧光物质在组织和细胞内的分布，以达到对细胞的特定物质进行定性、定位和定量观察的目的。荧光的来源除了组织和细胞的自发荧光以外，还可以主要由以下3种途径产生：

（1）荧光蛋白强制表达 通过基因融合和克隆技术在外源基因上连接一个荧光蛋白，如绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）、红色荧光蛋白（red fluorescent protein, RFP）等，强制其在培养细胞中表达。

（2）荧光染料染色 例如吖啶橙可以对细胞内的DNA、RNA同时染色，显示不同颜色的荧光，DNA呈绿色荧光，RNA呈橙色荧光。

（3）免疫荧光（immunofluorescence）技术 荧光染料可以和抗体的共价键结合，这种标记的抗体再和相应的抗原结合形成抗原抗体复合物（详见本章第二节“细胞化学技术”）。

样品可以是石蜡包埋的存档标本或新鲜冷冻组织标本，切片后经免疫荧光标记；也可以是新鲜的培养细胞经免疫荧光标记；也可以是强制表达荧光融合蛋白的培养细胞，可进行活细胞观察或经固定后观察。

由于荧光显微镜技术染色简便、敏感度高，图像色彩鲜明，而且便于多重染色，所以对于特异蛋白质等生物大分子的定性和定位是一种简便而有效的方法。

三、相差显微镜

相差显微镜（phase contrast microscope）是一种可以观察活细胞或未经染色标本的显微镜。相差显微镜能够改变直射光的相位，并且利用光的衍射和干涉现象，把相差变成振幅差（明暗差）。同时它还吸收部分直射光线以增大其明暗反差，因此可以观察活细胞或未经染色的标本。

相差显微镜一般多为倒置相差显微镜（inverted phase contrast microscope），适用于观察

活体细胞。它与一般相差显微镜的不同是光源和聚光器装在上方，相差物镜装在载物台下方，这样便于观察在培养瓶中贴壁培养的细胞，可清楚地分辨细胞的形态、细胞核、核仁以及细胞质中存在的颗粒，甚至研究细胞核、线粒体等细胞器的动态。

四、微分干涉相差显微镜

微分干涉相差显微镜 (differential interference contrast microscope) 又称 Nomarski 相差显微镜，其优点是能显示结构的三维立体投影影像。与相差显微镜相比，标本可略厚一点，折射率差别更大，使影像的立体感更强。

微分干涉相差显微镜利用的是偏振光，这些光经棱镜折射后分成两束，在不同时间经过样品的相邻部位，然后在经过另一棱镜时这两束光汇合，从样品中厚度上的微小区别就会转化成明暗区别，增加了样品反差并且具有很强的立体感。

微分干涉相差显微镜能使细胞核及较大的细胞器如线粒体等具有较强的立体感，比较适合于显微操作。目前多用于基因注入、核移植、转基因动物等生物工程的显微操作。将微分干涉相差显微镜接上录像机，可以观察活细胞中的颗粒及细胞器的运动。

【应用举例】

一、普通光学显微镜观察大鼠肝

- 目的 了解大鼠高脂饮食后肝的病理变化。
- 材料、试剂与方法 取普通饮食和高脂饮食大鼠肝组织约 5 mm 大小，置于甲醛中固定，经乙醇脱水，用石蜡包埋，将组织切成 5 μm 厚切片，经苏木精-伊红染色，光镜观察。
- 结果与讨论 对照普通饮食大鼠肝组织，高脂饮食大鼠肝组织在肝细胞细胞质中出现大小不等的圆形脂滴空泡，大者充满整个细胞，并将细胞核挤至一侧，似脂肪细胞。观察结果表明，高脂饮食大鼠肝组织明显出现脂肪变性，这表明高脂饮食与肝脂肪变性密切相关。

二、相差显微镜和荧光显微镜同时观察同一细胞的形态和荧光信号

- 目的 验证带有核定位信号的氧化还原探针 ro-GFP 在细胞核内有表达并反映核内氧化还原状态的差异。
- 材料、试剂与方法 将 HeLa 细胞培养在厚度为 0.17 mm 的玻璃底培养皿中，并置于配备有细胞培养小室的荧光倒置显微镜的载物台上。在相差视野中白光拍摄细胞轮廓，同时用蓝光激发细胞，拍摄照片并进行蛋白质定位。
- 结果与讨论 相差视野显示细胞核与细胞质及核仁与核质存在明显分界，核仁辨认清楚。结合相差视野的结果，得出结论：荧光视野下 ro-GFP 主要定位于核仁区室 (见 Yang et al. 2016)。

© 应用举例 1-1
相差显微镜和荧光
显微镜同时观察活
细胞