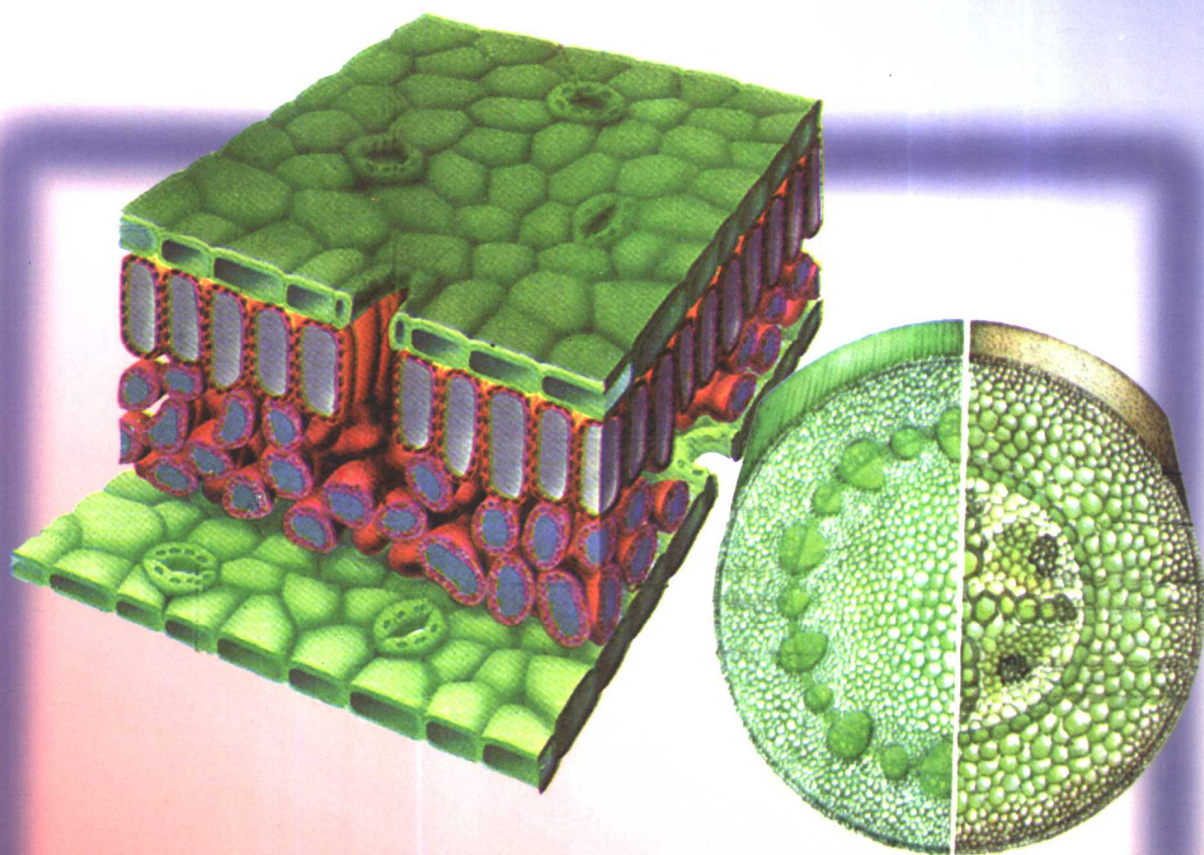


全国高等农林院校基础类课程教材

细胞学研究基础

李贵全 主编



中国林业出版社

全国高等农林院校基础类课程教材

细胞学研究基础

李贵全 主编

中国林业出版社

主编 李贵全
编者 李贵全 杜维俊 赫晓燕
主审 崔克明

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞学研究基础/李贵全主编. —北京: 中国林业出版社, 2001. 6
全国高等农林院校基础类课程教材
ISBN 7-5038-2814-5

I. 细… II. 李… III. 细胞学-研究-高等学校-教材 IV. Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 036760 号

出版: 中国林业出版社 (100009 北京西城区刘海胡同 7 号)

E-mail: cfphz@public.bra.net.cn **电话:** 66184477

发行: 中国林业出版社

印刷: 北京林业大学印刷厂

版次: 2001 年 6 月第 1 版

印次: 2001 年 6 月第 1 次

开本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 22.5

字数: 580 千字

印数: 1~4500 册

定价: 29.50 元

序 一

随着高等学校教学内容的不断发展和更新，农林院校对生命科学基础知识和基本实验技能方面的教学需要不断加强，特别是在研究生教育中更是如此。目前有些农林院校的本科生教学计划中已将《细胞学研究基础》列入，有关专业研究生学位课中几乎都有此内容。

本书的编者都有着较为丰富的此方面的教学和科研经验，又有较强的写作能力，其内容具有实用性和创新性，可供农学、林学、园艺、生物技术、动物医学等专业的学生使用，也可供农林科技人员参考。

本书的特点是由浅入深、由理论到实践，较全面系统地描述了动植物细胞学常用研究方法的原理和技术流程。并对实验中经常出现的问题作了较好的分析，指出了解决问题的途径和方法。

另外，本书不仅描述了传统的细胞学研究方法，如压片、制片、染色体分析、染色体带型分析、组织化学、细胞化学和显微摄影技术等，还介绍了近年发展起来的原位杂交、免疫荧光、免疫细胞化学和免疫金银法等细胞学研究方法。为学生将来走上工作岗位后进行有关科研工作打下良好的技术基础。

本书的第三个特点是将植物细胞学研究方法和动物细胞学研究方法综合起来写，既便于学生扩大知识面，又便于从事这两方面工作的人相互借鉴。

综上所述，本书无论从科学性和系统性上看，还是从先进性和实用性上看，都是一本较高水平的农林院校学生教材。

北京大学生命科学学院

崔克明

2000年2月23日

序 二

《细胞学研究基础》是多数高等农林院校的学生教材，目前一些院校已列入本科生的教学计划中。它依据农业生命科学的迅速发展，教学上必须打破传统的教学模式，建立新型综合教学体系，强调实践活动和动手能力，把理论知识与观察实验的探究方法结合起来，不但能提高教学质量，并为社会培养品学兼优的人才。

本书编者均为长期从事教学和科研工作的人员，具有丰富的实践经验，写作能力较强，在国内有较高的知名度，使本书可信度高，实用性强，创新点突出。可供农学、植保、林学、园艺、生物技术、动物医学等专业学生使用，也可作为农林科技人员的参考书。

本书以人们认识由简单到复杂过程，全面叙述动植物细胞学的研究方法，从介绍细胞学基本知识入手，对植物学、动物学及细胞学研究领域的各项实验技术的基本原理和流程作了详细而广泛的介绍，且对在实验中经常出现的问题和解决方法，进行了细致的科学分析。第二点，本书实用性强，全书始终贯穿由浅入深的写法，从细胞学研究的基本方法入手，直到目前国内外形态学研究的先进方法，表明系统性强和逻辑性强。在动物细胞学研究方法中，作者从动物捕杀、切片、固定等基础知识着手，使学生容易学习和掌握，又反映当前国内外细胞学研究领域前沿动态，如免疫组织化学法、PAP法和ABC法等，为学生今后从事本专业工作打下坚实基础，表明作者学术水平较高。第三点创新点突出，本书将动植物细胞学研究方法综合起来编写，在编写体制上做了重大改革，这样涉及面广，容易推广。在书中可见作者本人长期工作经验的总结。

总之，本书从科学性、先进性、系统性和实用性综合评定，学术水平较高，是国内高等农林院校同类教材中一本好书。

解放军军需大学动物科学系
杨维泰

2000年1月18日

前 言

著名生物学家 E. B. Wilson 早在 1925 年说过：“每一个生物科学问题的关键必须在细胞中寻找。”在新世纪生命科学蓬勃发展的时代，重读这一名言感到有很深的内涵。细胞作为有机体结构与生命活动的基本单位。细胞学研究方法是一切生命科学的重要基础学科。随着农业新技术革命的迅速发展，新的农业生物学课程的突出特点是以实验活动为中心，把提高学生的科学态度，发展技能和知识并重。传统的课程、教材、教法已不能适应新的课程的要求，为提高农林院校本科生、研究生的动手能力，只有把理论知识与观察实验的探究方法结合起来，才能取得良好的教学效果。为此，我们拟定编一本《细胞学研究基础》教材，供农学、植保、林学、园艺、生物技术、动物医学等专业使用，同时作为某些专业研究生的学位课和选修课，也可供从事农业科学的研究人员参考。

本书共分十七章，由三大部分组成：第一部分是植物细胞学研究方法，第二部分是动物细胞学研究方法，第三部分是显微摄影技术。其基本特点是从介绍细胞学基本知识入手，对植物学、动物学、细胞学研究领域的各项实验技术的基本原理和详细流程作了广泛介绍，而且对在实际操作过程中经常出现的问题和解决方法也进行了细致的科学分析。在编写过程中主要参考了北京大学生命科学学院李懋学老师的有关植物染色体研究技术的方法和流程，更进一步充实了本教材的内容。

《细胞学研究基础》已列入本科生的教学计划中，教学及实验时数安排为 60~80 学时左右，考虑到本书实用性强，可兼作农林科技人员参考用，故某些章节的内容略为偏多。在编写过程中，根据作者的不同专业特点，第一、二、三、七、八、九、十、十五、十六、十七章由李贵全编写；第四、五、六章由杜维俊编写；第十一、十二、十三、十四章由赫晓燕编写。全书由李贵全任主编并负责总体编写框架，由崔克明教授任主审。

经过长达两年的努力，本书终于将付梓出版了，这是一件令人欣慰的事。我们忠心感谢北京大学生命科学学院崔克明教授对全稿进行了仔细的审阅。本书在出版过程中还得到了中国林业出版社、山西农业大学的大力支持，在此，我们对所有关心和帮助本书出版的同志们表示真诚的谢意。

《细胞学研究基础》是一门发展中的学科，本书作者的知识范畴与能力毕竟是有限的，书中缺点和谬误在所难免，真诚地希望同行专家、学者与读者批评指正。

李贵全

2001 年元月

目 录

第一篇 植物细胞学研究方法

第一章 显微技术中的细胞学基础	(1)
第一节 细胞的基本概念.....	(1)
第二节 细胞增殖与周期的研究概况.....	(2)
第三节 细胞周期各时期的特点.....	(3)
第四节 细胞的减数分裂.....	(8)
第五节 植物胚胎学基础	(15)
第二章 植物染色体常规制片方法	(20)
第一节 取 材	(20)
第二节 预处理	(28)
第三节 压片法	(36)
第四节 低渗法	(45)
第五节 减数分裂的制片	(47)
第三章 植物染色体的分带方法	(50)
第一节 分带的历史和展望	(50)
第二节 Giemsa 带	(50)
第三节 荧光分带	(63)
第四节 显带机制	(64)
第四章 植物染色体的银染色技术	(67)
第一节 银染色技术的发展与应用	(67)
第二节 染色体的银染色原理	(71)
第三节 染色体银染法分类及技术流程	(73)
第五章 植物染色体核型分析	(79)
第一节 核型分析的意义	(79)
第二节 核型分析	(82)
第三节 染色体图像分析	(95)
第六章 植物的原位杂交	(99)
第一节 原位杂交的基本原理	(99)
第二节 染色体原位杂交技术.....	(100)
第三节 RNA 原位杂交技术	(122)
第四节 原位杂交的应用.....	(125)
第七章 植物组织器官制片的方法和原理	(129)
第一节 选 材.....	(129)
第二节 杀死、固定和保存.....	(130)

第三节 冲洗与脱水·····	(143)
第四节 透明及透明剂·····	(145)
第五节 浸透和包埋·····	(146)
第六节 切片·····	(147)
第七节 粘片及粘片剂·····	(150)
第八节 染色及染色剂·····	(151)
第九节 封 固·····	(164)
第八章 植物学制片的各类方法 ·····	(166)
第一节 徒手切片法·····	(166)
第二节 暂时封藏法·····	(167)
第三节 整体封固法·····	(168)
第四节 涂抹制片法·····	(170)
第五节 组织分离制片法(离析法)·····	(171)
第六节 滑动切片法·····	(172)
第七节 蒸汽切片法·····	(173)
第八节 冷冻切片法·····	(174)
第九节 火棉胶制片法·····	(175)
第十节 透明制片法·····	(176)
第十一节 显微研究特殊法·····	(177)
第九章 植物组织化学的简易测定法 ·····	(182)
附录·····	(185)
第十章 植物细胞学研究方法“经典实验” ·····	(189)
实验一 植物根尖染色体压片·····	(189)
实验二 花粉母细胞的涂片·····	(190)
实验三 去壁低渗法·····	(190)
实验四 核型分析·····	(191)
实验五 植物染色体 C—带技术(BSG 和 HSG 显带方法)·····	(192)
实验六 Ag-NOR 染色技术·····	(194)
实验七 整体封片法·····	(195)
实验八 徒手切片法·····	(197)
实验九 冰冻切片法·····	(197)
实验十 石蜡切片法·····	(199)
附录 1 本实验课所用药品配方·····	(203)
附录 2 植物细胞遗传学观察材料简介·····	(206)
附录 3 我国重要经济植物染色体数目·····	(210)

第二篇 动物细胞学研究方法

第十一章 动物组织切片制作的基本原理和技术 ·····	(221)
第一节 概 述·····	(221)
第二节 动物的杀死和取材·····	(222)

第三节	固定和固定液·····	(224)
第四节	洗涤和脱水·····	(228)
第五节	透明、透入和包埋·····	(229)
第六节	切片、展片和贴片·····	(232)
第七节	染色及染色后的处理·····	(232)
第八节	石蜡切片、火棉胶切片和冰冻切片制作程序·····	(238)
第十二章	一些主要的细胞器、组织和器官的制片方法·····	(240)
第一节	细胞器·····	(240)
第二节	上皮组织·····	(242)
第三节	结缔组织·····	(242)
第四节	肌组织·····	(250)
第五节	神经组织及神经系统·····	(252)
第六节	脉管系和淋巴器官·····	(257)
第七节	消化系·····	(257)
第八节	呼吸系·····	(262)
第九节	泌尿系和生殖系·····	(262)
第十节	内分泌腺·····	(264)
第十一节	皮肤、眼球及内耳·····	(266)
第十三章	细胞化学与组织化学·····	(268)
第一节	概 述·····	(268)
第二节	核 酸·····	(268)
第三节	蛋白质·····	(272)
第四节	糖 类·····	(276)
第五节	脂 类·····	(280)
第六节	酶 类·····	(283)
第七节	荧光组织化学·····	(293)
第十四章	免疫细胞化学·····	(297)
第一节	免疫细胞化学技术概述·····	(297)
第二节	免疫荧光细胞化学·····	(301)
第三节	免疫酶细胞化学·····	(303)
第四节	亲和免疫细胞化学·····	(306)
第五节	免疫金-银细胞化学·····	(307)
附录	细胞化学与组织化学及免疫细胞化学中常用试剂的配制方法·····	(310)

第三篇 显微摄影技术

第十五章	显微镜的光学部件·····	(313)
第一节	物 镜·····	(314)
第二节	目 镜·····	(316)
第三节	聚光镜·····	(317)
第四节	显微镜的照明装置·····	(318)

第五节	显微镜的光轴调节.....	(320)
第十六章	显微照相的装置.....	(322)
第一节	显微摄影的照相设备.....	(322)
第二节	被摄显微制片的准备.....	(327)
第三节	感光片的使用.....	(328)
第十七章	冲洗与放大.....	(332)
第一节	黑白底片的冲洗.....	(332)
第二节	印相与放大.....	(336)
第三节	底片和照片的后加工.....	(339)
第四节	显微照相常用的几种附件.....	(342)
参考文献		(345)

第一篇

植物细胞学研究方法

第一章 显微技术中的细胞学基础

第一节 细胞的基本概念

生命之所以通过细胞具有连续性，是因为细胞有一定的结构，能进行自我复制。关于这个结构的物理和化学性质在 20 世纪遗传学兴起之前只知道大概，随着生命科学的发展认识到染色体维持它们的完整性。而染色体是基因的载体，它支配遗传和变异，并控制发育。而染色体自身的结构和行为也受基因的调控。因此，研究染色体的数目、结构和行为的变异，探讨其发生和发展的机制和规律，进而达到人工控制和改造生物遗传变异的目的，始终是生命科学的核心内容。

细胞是生命活动的基本单位，一切有机体均由细胞构成，只有病毒是非细胞形态的生命体。每一个细胞，不论是低等生物或高等生物的细胞，简单或复杂的细胞，分化与未分化的细胞，高等生物的性细胞或体细胞，都包含着全套的遗传信息，也就是说，包含着遗传的全能性。由单个植物的雄性生殖细胞或单个体细胞经人工培养与诱导发育为完整的植株，是这一论证的最有力的证据之一。从动物的大部分组织游离分散出来的单个细胞大多数可在体外培养，生长，繁殖与传代，这些试验的基本事实均可以说明，虽然细胞是构成统一机体的小小的局部，并受到机体整体活动的制约，但每一个细胞在生命活动中又是一个小小的“独立王国”，在特定条件下，它可以明显的表现为生命活动的独立单位。因此，细胞是生命活动的基本单位之一概念是有充分科学依据，并愈来愈为人们所接受。

显微技术中的细胞学研究方法，就是在细胞的水平上对生物的形态发育，系统分类，组织解剖，胚胎等各个方面进行深入的研究。认识到细胞的重要性后，本章将对细胞的形态，特征，整个细胞的发育周期进行描述，这对从事生命科学研究的学生和研究人员是基础的基础。总之，细胞可以被看做是生命的控制者，它对生物的遗传、变异、进化、发育等重大的生物学问题无不和细胞结构、染色体的行为有密切的关系。众所周知，植物染色体只有在细胞分裂时才出现，经染色在光学显微镜才可以看到，因此说染色体的出现又和细胞分裂是密切相关的。现在已经清楚地认识到不论是有丝分裂或者是减数分裂它只是细胞增殖的一个时期，在分裂间期的细胞核中还发生着对染色体形成必不可少的重要事态。那么就可以说从一次细胞分裂到另一次细胞

分裂之间所经历的全部过程称为细胞周期。为了对染色体的形成活动有一个全面的了解,所以掌握细胞周期是十分重要的,是为我们研究染色体和掌握细胞学研究方法的基础。

第二节 细胞增殖与周期的研究概况

细胞的繁殖是生物最根本的特征,细胞是借助于分裂来进行增殖的。通过细胞分裂可将复制的遗传物质平均地分配到两个子细胞之中。无细胞分裂便不会有生物的生长、分化、遗传和进化。在真核生物中遗传物质的分配要比原核生物复杂的多。原核生物的遗传物质是以裸露的DNA单个分子而存在,DNA附着在质膜的位点上,一旦复制后,两个DNA分子附着点之间的质膜,借助于生长而延长,在中间生成新的隔壁而分裂为两个细胞。人细胞中DNA含量为大肠杆菌的一千多倍,DNA在S期复制后,两套DNA分子通过复杂的有丝分裂过程将其平均分配到两个子细胞中去。另一种分裂方式为无丝分裂,这种方式比较简单。一般是核仁先分裂成两个或多个,细胞核拉成亚铃状,最后分成两个或多个核,子核之间细胞质缢缩,分成两个或多个子细胞。此种无丝分裂多出现在动植物生长旺盛的,繁殖迅速的器官,这种方式分裂快,时间短,而且消耗能量少。另外在衰老和病理条件下无丝分裂也有增多。细胞处在不良条件下也发生无丝分裂,如培养细胞加热和冷却等,由于这种分裂方式简单,也不够普遍,因而研究的也比较少,我们着重介绍有丝分裂。

发现细胞分裂已有100多年的历史,但是只是在Mayzel(1875年)描述了核的分裂动态过程之后有丝分裂才引起人们的注意。当时一些有洞察力的研究工作者已经注意到,在有丝分裂过程中核物质平均地分配到两个子细胞中的现象,因而设想可能细胞的遗传物质在核中编码,更可能是在染色体上编码。由于当时对分裂期之外的时期生化变化了解很少,而把细胞活动分为分裂期和静止期(后称间期)。把静止期看成是“一潭死水”,1944年艾弗里(Avery)显示肺炎球菌的致病性是由DNA传递的,从而认识了DNA是基因的物质基础。后来斯威夫特(Swift)(1950年)用孚尔根分光光度术证明DNA复制并不是有丝分裂开始的,而是发生在间期。因此间期并不是一个代谢不活跃的静止期。细胞增殖包括两个基本事态:一是有丝分裂,另一个是有丝分裂前必须进行的DNA的合成。Swift(1950年)用显微分光光度计的方法测定了处于分裂期的二倍体细胞的DNA含量,发现许多细胞DNA含量处于2C和4C之间。1953年Howa(霍华德)和Pelc(皮尔)用 ^{32}P 磷酸盐作为标记物,浸泡蚕豆实生苗,然后于不同时期取根尖作细胞放射自显影的研究。发现细胞分裂间期有一个DNA合成期, ^{32}P 只在这个时期才掺入到DNA中,还发现在DNA合成期(S期)和分裂期(M期)之间有一个间隙为 G_2 期,在M期后和S期之间有另一个间隙为 G_1 期均不能合成DNA,他们第一次提出细胞周期的概念。增殖细胞的细胞周期;是处于母细胞分裂后形成的细胞到下一次再分裂形成两个子细胞之间的时期。

关于细胞周期的知识近20年来有了很大的发展,这是由于在细胞周期的研究中应用了3个重要技术的结果:①在细胞培养中发展了诱导同步分裂的方法,打开了利用细胞周期不同时期的材料进行生化分析的途径;②特殊染色反应后对细胞核中DNA含量的显微分光光度术的定量测定技术的应用;③引进了用胸苷标记的放射自显影技术。

必须强调指出,细胞周期的概念不仅把间期划分为更详细的时期,更重要的它是一个周期间的过程。真核生物细胞的生长和繁殖包括所有原生质成分的复制,细胞复制的结果,在植物细胞中细胞质为质膜和细胞壁所分隔,因此,胞质分裂为细胞周期提供了一个划分的标志。在

此之前,所有细胞成分的复制和分离必须完成;在此之后,复制事态的新的周期才能开始,即细胞后代又恢复到开始时的状态,为此周而复始,循环不息,在这一点上,在细胞周期中的细胞和在分化中的细胞不同。分化中的细胞是按直线程序变化的,直至最后死亡。在非增殖情况下的细胞处于既非 G_1 ,又不是 G_2 的代谢特点中,其代谢特点并不导致细胞的复制,细胞的这种状态有些作者以 G_0 表示,即细胞从细胞周期中脱离出来,进行另一途径的发展,如果细胞在 G_1 时期脱离周期,则 G_0 时的细胞 DNA 量已加倍。 G_0 状态的细胞可以进行各种分化,可在不定长的时期内,几天、几月、甚至几年维持 G_0 状态。 G_0 状态的细胞在一定条件下仍可恢复到周期中,继续进行细胞周期的过程。

第三节 细胞周期各时期的特点

一、间 期

1. G_1 期 G 是“Gap”的缩写,即间隙之意。 G_1 期也叫第一间隙期 (gap₁ phase),它是指从有丝分裂完成到 DNA 复制之前的这段间隙时间,所以又称之为复制前期 (preduplication stage),合成前期等。

哺乳动物细胞 G_1 期变化很大,由几小时到几天或更长,同一系统的细胞根据部位不同,细胞周期时间也不同,细胞分裂的速度愈快,此阶段愈短,在某些细胞中 G_1 期可以缺少,而在另一些细胞周期很长的细胞中 G_1 期可以经历很长的持续时间。有些细胞如艾氏腹水癌细胞,胚胎早期细胞,造血干细胞都测不出 G_1 期,因而很可能在有利于快速增殖的条件下 G_1 期缩得很短,甚至为零。在 G_1 时期 DNA 合成还未开始。因此核的 DNA 含量保持在原来二倍体细胞的量。以 $2C$ 表示。此时是 DNA 的相对含量。所有 RNA 种类的合成是从 G_1 开始到周期结束都在进行,是同时的和连续合成的。在 G_1 早期 rRNA 合成的突然开始的结果,导致核仁体积开始增大。因为在 G_1 决定细胞再分裂或进入分化, G_1 细胞在合成上是极活跃的,在进入细胞周期和将进行 DNA 复制的核中,最初的复制需要蛋白质,以提供所需要的生物合成的酶和某种可能的“启动蛋白”及其他蛋白, G_1 时期合成的蛋白质大量累积在细胞质中,因此常常可以看到核还未被细胞质的蛋白质所包围前, DNA 的合成并不开始的。各种细胞在 G_1 期所进行的生物合成与各细胞的特性有关,如培养的淋巴细胞在此期可以合成免疫球蛋白 IgG 中的 L 链;黑色素也是在 G_1 期合成,肌动蛋白也是 G_1 期细胞的产物。

2. S 期 即 DNA 合成期 (synthesis stage),或称复制期 (duplication stage)。S 期主要是 DNA 合成 (自我复制) 的时期。

哺乳动物细胞的 S 期一般为 6~8h, DNA 含量在此时期增加 1 倍。一个人的细胞的 DNA 含量为 $10^{-11}g$,如接成一根 DNA 分子链可长达 3m,包藏在一个 10~20 μm 直径的细胞核中,如何能在此短短的几个小时中完成 DNA 复制呢?主要是 DNA 链上分成许许多多的复制单位,每个复制单位大约长 30 μm ,一个细胞可能有 1 万~3 万个复制单位,在 S 期中许多复制单位在不同时间活动。每秒钟有 250 000 个 A-T, G-C 碱基配对。这样才能使 DNA 在 6~8h 之间复制完毕。S 期的长短不同,一般认为是和活动的复制单位的数目有关。DNA 复制的顺序总是一定的, x 染色体的长臂总是在 S 期之末才复制;编码 rRNA 的基因总是在 S 期前半复制。早期复制的 DNA 富有 G-C 碱基。晚期复制的 DNA 富有 A-T 碱基,即常染色质比异染色质复制较早。S 期

的活动是由于细胞内产生了一种蛋白性的 DNA 合成诱导者。如将 S 期细胞和 G_1 期细胞在仙台病毒的作用下融合, 继续培养, 可引起 G_1 期细胞核 DNA 复制提前, 这说明 S 期细胞的诱导者可以影响 G_2 期细胞核。在 S 期 DNA 合成的同时, 也有组蛋白的合成。现已经证明 DNA 双链是缠在核小体核心之上的, 它是由 4 种组蛋白的 8 个分子组成的八聚体。组蛋白不仅是 DNA 分子缠绕的支架, 而且具有控制作用, 如果同时没有组蛋白的合成, 则复制的 DNA 基因活动就不能控制, 如继续转录则会造成细胞功能的紊乱。如在 S 期加入 DNA 合成抑制剂——羟基脲及阿糖胞苷等, 同时组蛋白的合成也受到抑制, 说明二者之间有密切的关系。

在真核生物中会提出这样的问题: 每个染色体包含多于一个 DNA 分子还是只有一个 DNA 分子。这是一个有争论的问题。证明 DNA 分子必须通过整个染色体, 不能在着丝粒处中断。应用一些新技术, 现在已能显示一个 DNA 分子的大小和一个染色体中 DNA 分子相当的, 即分子量在 $20 \times 10^9 \sim 80 \times 10^9$ 。因此现在倾向于认为一个染色体中只有存在一个 DNA 分子。

因为 DNA 复制是非同步的, 所以在 S 期 RNA 的合成继续在进行。但一般认为复制中的 DNA 片断是不转录的。活跃的蛋白质合成也是在 S 期进行, 提供 DNA 合成的本身所需要的酶和构成染色体所需要的蛋白质, 由细胞显微分光光度术, 放射自显影的生化分析, 在许多动、植物材料中显示组蛋白的合成是和 DNA 复制协同发生的。因此随着 DNA 的加倍。组蛋白也加倍, 组蛋白在细胞质内合成, 然后转移到核内和新合成的 DNA 结合。像其他核蛋白一样, 染色体的酸性蛋白也在细胞质中合成, 它们一般和 DNA 的合成没有相关性。

3. G_2 期 指从 DNA 复制完成到有丝分裂开始的这段间隙时间, 所以又称第二间隙期 (gap₂ phase) 或称复制后期 (postduplication stage), 或合成后期。一般持续 1~1.5h, 有活跃的 RNA 和蛋白质合成。一些工作证明 G_2 期细胞内有微管蛋白的合成, 为 M 期纺锤丝微管的组装提供原料。蛋白质的合成在 G_2 期继续进行, 但这一时期所得到的蛋白质谱和前一时期十分不同, 同时与有丝分裂时染色体螺旋化有关的蛋白和组成纺锤体的微管蛋白可能在 G_2 时期形成。在 G_2 ——早前期过渡时开始形成微管。

二、M 期

经 G_2 期之后即进入 M 期, 称为有丝分裂期 (mitosis stage), 以前称为 D 期 (division stage)。细胞在 M 期进行有丝分裂。M 期根据染色体的变化又分为前期 (prophase)、中期 (metaphase)、后期 (anaphase) 和末期 (telophase)。

1. 前期 前期的主要特征是染色质浓集, 确定分裂极, 核仁的解体, 及核膜的消失。细胞经 S 期的 DNA 复制后, 通过 DNA 分子的螺旋化和折叠, 每条双螺旋链逐渐缩短, 形成一条染色单体, 到中前期已经看到成双的结构; 这时可见染色体上有一对对着丝粒 (centromere), 每条单体上一个, 位于染色体上较为纤细的主缢痕 (primary constriction) 部位, 姊妹染色单体在着丝粒部位相连, 核仁逐渐缩小, 到前期末核仁及核膜消失, 分散到细胞之中, 中心粒出现于动物细胞和低等植物细胞, 中心粒通常在 S 期已经加倍, 有的是在分裂之前开始复制。中心粒是成对出现的细胞器, 每个中心粒由 9 组微管围成, 为一中空的小圆柱体, 每组有微管 3 条。中心粒直径为 $0.5 \mu\text{m}$, 长度大于 $0.5 \mu\text{m}$, 两个中心粒垂直相邻。复制时由每个中心粒的一端垂直长出一个原中心粒, 在前期时已经有两对中心粒。中心粒位于核膜附近的细胞质中, 在中心粒的周围形成星体, 它是由短的微管组成, 向周围辐射。随前期发展, 这两对中心粒连同星体一起逐渐分离, 达到相对的位置, 决定了细胞分离的两极。两中心粒之间的微管延长, 形成纺锤体, 染色体逐渐集中于赤道部位, 植物细胞无中心粒也能形成纺锤体, 由何种因素确定两极尚

不清楚。

2. 中期 核膜消失即开始进入前中期, 纺锤丝侵入中心区, 部分纺锤丝开始附于着丝粒 (Kinetochores) 上, 染色体进行振荡运动, 一直到辐射状地排列在赤道面上, 形成赤道板。植物细胞染色体占据整个纺锤体的赤道面上。一般小的染色体排列在内侧, 大的在周缘。纺锤体包括三种纤维, 连接极和染色体的称之为染色体牵丝; 从一极伸到另一极的为极间丝; 连接后, 末期二组子染色体的为区间丝。染色体之所以能够规则地排列在赤道板上和一条染色体上有两极而来的染色体丝固定于着丝粒上有关, 由于力量的平衡而使其排列于赤道板。用巯基乙醇破坏纺锤丝则染色体不能排在赤道板上, 若去掉药物又可恢复; 无着丝粒的染色体断片则不能排在赤道板上。中期染色体的形态, 通常作为每一物种染色体的基本形态。由于分裂中期时的细胞粘滞度改变, 染色体又高度的浓缩, 因此, 在外界的压力下易于在整个细胞中分散, 所以这个时期是对染色体进行计数的最适时期。

3. 后期 每一染色体的着丝点分裂, 两个染色单体彼此分开, 在后期几乎所有的染色体同时分离, 染色单体开始向极运动, 似乎是染色体丝把染色体拉向两极。因为着丝粒部位不同, 后期染色体的形态也不同, 中部着丝粒者呈 V 形, 亚端部着丝粒的呈 J 形; 端部着丝粒的呈棒状, 显然和着力点有密切关系。若用低温处理或用有丝分裂有毒药物秋水仙碱破坏纺锤丝则染色体不能牵向两极。辐射损伤所引起的无着丝粒断片后期也不能拉向两极。如果着丝点的分裂并未受到药物的抑制。则可以照样分裂。但各染色体却不能分向两极, 细胞分裂不能进行下去, 这便产生了多倍体。如果一个染色体失去了着丝点, 它就会迷失方向, 往往在转圈地移动, 但不能进入两极, 最终会消失, 这就有可能产生缺体细胞 ($2n-2$) 是异源多倍体的特征。

4. 末期 子染色体向两极运动的结束即标志着末期的开始, 染色体开始解螺旋, 染色质逐渐集合在一起成为若干块状, 在其周围开始由内质网及原来崩解的核膜小泡重新组成核膜, 核仁重现。由进化的观点看来, 一些学者最初主张发生质膜, 然后内质网来源于质膜, 核膜来源于内质网, 在许多动植物细胞电镜照片中可见内质网和核膜相连。Moore 等对 50 个属的真菌进行了观察, 结果发现核膜经常与内质网相连, 而内质网又和质膜相连续。

末期的染色体逐渐积聚, 个体性比较模糊, 随后, 核膜重新形成, 逐渐进入间期的状态, 由此可见, 末期正是前期的逆转。

5. 胞质分裂 在染色体解螺旋和核膜形成的同时发生胞质分裂。动物细胞的胞质分裂多用卵和培养细胞进行研究。在中及晚末期赤道部位的纺锤丝周围出现密度高的物质, 虽然这时纺锤体的微管趋向于瓦解和消失, 但赤道板处反而增多, 经常和一系列小囊状物以及密度高的物质相掺和, 整个结构称之为中体, 与此同时, 细胞表面在赤道部位向内缢缩凹陷, 逐渐加深而达到中体, 最后细胞完全分离。在赤道板的质膜下细胞质产生的缢缩环可能是由微丝组成, 若用破坏微丝的药物细胞松弛素 B, 缢缩细胞又恢复原状, 有些实验证明在细胞凹陷沟的质膜下可以看到有肌动蛋白与肌球蛋白样的纤维和胞质的分裂有关 (图 1-1)。

植物细胞胞质分裂的特点和动物不同, 不是胞质的缢缩, 而是在赤道板处由纺锤体微管, 高尔基小泡及内质网囊的颗粒、小泡等形成成膜体, 由它再融合成细胞板, 进而在细胞板的两侧, 有多糖类积累形成细胞壁, 最后分成两个细胞。在胞质分裂过程中, 线粒体和高尔基体等细胞器也分配到两个子细胞中去。

三、主缢痕和着丝点的结构

在染色体上有一个凹陷部位称之主缢痕, 在此部位两条染色单体的染色丝的相互攀绕掺

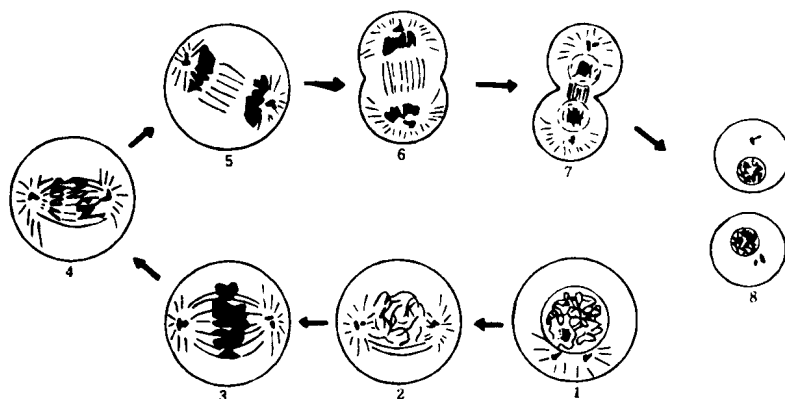


图 1-1 动物细胞有丝分裂图解

1. 早前期； 2. 晚前期； 3. 中期； 4. 早后期
5. 晚后期； 6. 早末期； 7. 晚末期； 8. 间期

杂，而把两条染色单体结合在一起，此部位孚尔根反应染色显示有弱的 DNA 阳性反应，说明有 DNA 链通过。染色体在主缢痕处有一特化部位，称之为着丝点，它是一种附加上的结构，每条染色单体上一个。着丝点多呈盘状，直径为 $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ ，有的长可达 $1.4 \mu\text{m}$ ，宽仅为 $0.4 \mu\text{m}$ 。一般可分为三层，外层厚 $30 \sim 40 \text{nm}$ ，电子密度高，有一定结构，中层厚 $15 \sim 60 \text{nm}$ ，为电子密度低的结构；内层 $15 \sim 40 \text{nm}$ ，出现有类似染色质的颗粒，但是更致密。着丝点的主要化学成分可能为碱性蛋白，但不排除有其他物质。高等植物细胞着丝点为球形或杯状，染色体丝在中期和着丝点相连，可以穿透着丝点的各层。附着在一个着丝点上的纺锤丝数目，动物细胞多为 $5 \sim 20$ 条，植物细胞多者可达 150 条。

四、有丝分裂装置的精细结构和功能

有丝分裂装置是指中心粒，围绕中心粒的星体和丝状的纺锤体，在固定的标本中星体看起来似乎是一组辐射纤维围着中心粒汇集。围绕中心粒有一个透明区，称之为中心粒团 (microcentrum)，再外面还有一圈染色较深的区域称之为中心球，总称之为中心体。星体及纺锤体纤维并不穿透透明区到达中心粒。1952 年海胆卵中分离出单个的分裂装置，证明了它是一种实在的东西，并非固定和染色造成的假象。

纺锤体和星体是由微管组成，微管为圆柱状的结构，直径 $22 \sim 25 \text{nm}$ 。长可达数微米。电镜下可见微管为中空的小管，横切面为环状，由 13 条原丝纵向排列组成微管，微管的基本组成单位为微管蛋白，它包括 α 和 β 二种亚单位，二者在细胞内经常组成为二聚体。

关于微管重组的机制提出若干模型，这些模型是根据聚合反应进行过程中在电镜下所见的种种结构而建立的。Kirshner (1975 年) 等的模型，首先是环的解开，形成带状排列，继而横向结合形成片状，片的两端封闭，形成 13 条原丝围成的微管。Borisy 等 (1976 年) 的模型认为首先是几个环重叠形成一个垛，成为聚合的核心，微管蛋白二聚体逐渐附加到上面，延长微管。解聚时相反，从微管的端部微管蛋白顺次离解。

有关有丝分裂过程中染色体运动机制的早期概念，都集中于细胞内的物理状态的改变，如电磁场，溶胶和凝胶的变化，染色体的自动迁移等，但这些概念已为人们所放弃，现在的注意力多放于纺锤丝微管和染色体的运动关系上。主要有 3 种假说：

(1) 收缩机制。把纺锤体的染色体牵丝比作拉长的橡皮筋，当其缩短时可把染色体拉向两

极。然而在电镜观察中并未见微管的变粗，而且在后期极间丝反而变长，因而这一假说很少为人们所支持。

(2) 滑动微管机制。1967 年 McIntosh 所提出，他认为染色体的后期向极运动和肌肉收缩或纤毛运动相类似。根据这一假说，当染色体丝和极间丝相互滑过时，微管的覆盖部分增加，因而染色体丝变短，运动所需的力将产生于纤维相互滑行时，许多桥或化学键交替地破坏及再形成，事实上也看到纺锤体向极的一端微管的数量增加了。现在电镜观察证明微管之间有横桥的存在。而具纺锤丝上有较高的 ATP 酶的活性，因而也可能通过 ATP 分解而取得能量以拉动染色体。然而此种纺锤丝系统和纤毛或肌肉系统相比较时，至少有一个重要方面是不同的，即在两种丝之间没有严格的空问关系，而纤毛或肌纤维显示的显微构筑，使其适于纤维的结合和去结合。如某些细胞中染色体丝分布在空的纺锤体的内缘，两极间的极间丝是在纺锤体的轴部成囊状通过，在空间上两种丝是分离的，而后期仍然发生染色体向极移动，因此这一假说难于解释。

(3) 微管的组装——去组装机制。这一假说是 1976 年 Inoue 根据细胞内存在一个微管蛋白库和纺锤体微管聚合之间是一个平衡的混合物而提出的。他认为染色体的向极运动是由于染色体的微管在向极的一端发生了微管蛋白亚单位的去组装所致。由于去组装而使染色体丝缩短，把染色体拉向两极。另一方面释放出的单位或者流入库中，或者在极部参加极丝的组装而使其延长，在后期区间丝的不断延长也对染色体起着推动作用。后期还可以看到纺锤体在极部的双折射特点变得模糊。说明极部的微管亚单位的去组装。染色体的向极运动不仅很慢 ($1\mu\text{m}/\text{min}$)，而且需能很少，根据染色体大小及周围胞质的黏度资料，一条染色体由赤道板移到极部大概 10^{-13}N ，要消耗 30 个 ATP 分子，比鞭毛运动所需能小两个数量级。对分离的纺锤体进行化学测定，发现 ATP 酶在两极更为集中，它提供了分解 ATP 产生能量供应的机制。然而是否由于染色体丝向极端的微管蛋白亚单位的去组装而产生了一种拉力仍有不少疑问。微管蛋白分子组装进微管中而推动染色体或其他结构，这一点是可以理解的。例如中心粒在前期时向极部推动，在前中期时染色体在着丝粒处有微管蛋白的组装，纺锤体变长，促使染色体排列在赤道板上。然而对于微管蛋白亚单位的去组装可以拉动什么东西，却令人费解。有人认为染色体牵丝只是起定向作用，而不是动力来源，而动力却是来源于其他装置。

五、有丝分裂的修饰

生物界中有些种类的细胞或者在一定条件下的有丝分裂，并不像前面所述那样规律，有许多变异。

多线染色体：双翅目的一些昆虫以及其他一些种类，DNA 复制反复进行而无细胞分裂，因为缺少分裂期，而形成巨大的多线染色体，如果蝇、摇蚊的唾腺染色体。

核内有丝分裂：某些细胞经过若干次 DNA 复制，染色体彼此分离，因为分离的染色体仍在同一核膜包被之内，而称为核内有丝分裂，如成年哺乳动物的肝具 4, 8, 16, 甚至 32 倍体的细胞核。秋水仙素处理可阻断微管蛋白的组装，染色体不能分到两极，因而可使染色体加倍，用于多倍体育种。

多极有丝分裂：多极分裂在动植物细胞中均有。多极分裂可形成多个细胞，在癌细胞比较多见。除了自然发生之外，人工诱导也可以产生，如温度休克、低浓度的秋水仙素、抗生素、环己醇等。多极分裂结果使多倍体减低其倍性的水平。