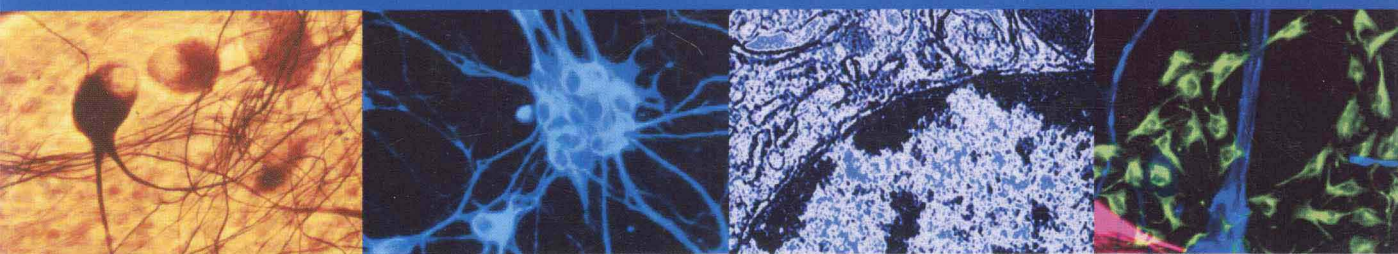


全国高等医药院校规划教材

供基础、临床、检验、预防和医学影像等专业用



医学细胞生物学

徐 冶 王弘珺 田洪艳 主编



科学出版社

全国高等医药院校规划教材
供基础、临床、检验、预防和医学影像等专业用

医学细胞生物学

徐 冶 王弘琚 田洪艳 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书根据编写大纲的要求,并总结了编者多年的医学细胞生物学教学实践,联系医学实际,参考多种细胞生物学、医学细胞生物学等方面的教材、专著编写而成。全书共15章,内容包括绪论、细胞生物学研究方法、细胞的分子基础、细胞膜及物质跨膜运输、细胞的内膜系统、细胞核、细胞骨架、线粒体、细胞连接与细胞外基质、细胞信号转导、细胞增殖、细胞分化、细胞衰老与死亡、干细胞、细胞工程等。

本书可作为高等医学院校本科医学细胞生物学课程的教材,也可作为医学研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学/徐冶,王弘珩,田洪艳主编. —北京:科学出版社, 2013.7

全国高等医药院校规划教材

ISBN 978-7-03-038040-1

I. ①医… II. ①徐…②王…③田… 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(2013)第136041号

责任编辑:丛楠/责任校对:郑金红

责任印制:阎磊/封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年6月第一版 开本:787×1092 16

2013年6月第一次印刷 印张:14

字数:315 000

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《医学细胞生物学》编委会名单

主 编 徐 冶 王弘珺 田洪艳

编 委 (按姓氏笔画排序)

王弘珺 田洪艳 朱辛为

李质馨 徐 冶 鲁质博

潘晓燕

主 审 窦肇华

前 言

细胞生物学是从细胞的显微水平、亚显微水平和分子水平对细胞的结构及其生命活动规律进行研究的科学。医学细胞生物学 (medical cell biology) 是细胞生物学与医学的交叉学科, 主要阐明与医学有关的细胞生物学问题, 是探讨人体细胞的功能、发生、发展、衰老、死亡的生命活动规律的科学。近代细胞与分子生物学的研究已经为整个医学科学的理论与实践开拓出以前无法想象的广阔前景。细胞生物学与医学的关系非常密切, 它是现代医学的重要基础, 其理论与实践的进展必将极大地促进基础医学和临床医学的深入发展。

本书是根据教学大纲的要求, 同时总结了编者多年的教学经验编写而成。教材内容的选取, 首先把握“必须、适用”的原则, 阐述了医学细胞生物学的基本理论、基本概念和研究进展, 并有意识、有选择地对某些热点问题进行讨论, 激发学生的学习热情, 开拓学生的思路和视野, 以更好地满足高等学校培养适应 21 世纪需要的高质量人才的实际需求。全书共分 15 章, 第 1~3 章为细胞生物学概述, 重点讲授细胞生物学的概念、发展历程、研究方法及细胞的分子基础; 第 4~8 章为细胞的结构与功能, 重点讲授细胞各部分结构及主要生物学功能; 第 9~13 章为细胞的社会性及基本生命活动, 重点讲授细胞间的联系及细胞的增殖、分化、衰老与死亡; 第 14、15 章为细胞工程, 重点讲授干细胞及其应用、细胞工程的主要技术及应用。教材中引用大量图片, 并适量增加了英文词汇量, 书后附有主要参考书目和中英文索引。本教材可作为高等医学院校本科医学细胞生物学课程的教材, 也可作为医学研究人员的参考书。

本书主要参考了陈誉华主编的《医学细胞生物学》(第 4 版)、安威主编的《医学细胞生物学》(第 2 版)、凌诒萍主编的《细胞生物学》、罗深秋主编的《医学细胞生物学》、胡以平主编的《医学细胞生物学》、余从年等主编的《医学细胞生物学导论》、王庸晋等主编的《医学细胞生物学》、黄百渠等主编的《细胞生物学简明教程》等书; 书中的一部分插图也选自上述教材, 一部分插图参考了互联网上的图片。在此也向原书及原图作者表示衷心的感谢。

本版教材的编写方式是一种尝试, 我们期望能编写出一部好的医学细胞生物学教材, 尽管我们已倾尽全力, 但由于编者水平、能力和学识有限, 内容的取舍、编排难免有不妥和疏漏之处, 更难做到文笔精练、流畅。恳请广大师生与读者不吝赐教, 以便再版时改正, 使本教材日臻完善。

编 者

2013 年 1 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 细胞生物学的概念和研究内容	1
第二节 细胞生物学发展简史	2
第三节 细胞生物学与医学	4
第二章 细胞生物学研究方法	6
第一节 显微镜技术	6
第二节 细胞的分离和培养	10
第三节 细胞组分的分离和分析	14
第三章 细胞的分子基础	21
第一节 生物小分子	21
第二节 生物大分子	22
第四章 细胞膜及物质跨膜运输	28
第一节 细胞膜化学组成	28
第二节 细胞膜的分子结构	33
第三节 细胞膜的特性	36
第四节 物质跨膜运输	39
第五节 细胞表面的特化结构	47
第六节 细胞膜与医学	50
第五章 细胞的内膜系统	52
第一节 内质网	52
第二节 高尔基复合体	59
第三节 溶酶体	63
第四节 过氧化物酶体	68
第六章 细胞核	71
第一节 核被膜	72
第二节 染色质和染色体	75
第三节 核仁	82
第四节 核基质	86
第五节 细胞核与疾病	88
第七章 细胞骨架	89
第一节 微管	89

第二节 微丝	97
第三节 中间纤维	105
第四节 细胞骨架与疾病	108
第八章 线粒体	110
第一节 线粒体的形态结构和化学组成	110
第二节 细胞呼吸	114
第三节 线粒体的半自主性	118
第四节 线粒体的增殖与起源	122
第五节 线粒体与医学	123
第九章 细胞连接与细胞外基质	125
第一节 细胞连接	125
第二节 细胞外基质	134
第十章 细胞信号转导	144
第一节 细胞外信号	144
第二节 受体	145
第三节 细胞膜受体介导的信号转导	147
第四节 细胞信号转导的特点	154
第五节 信号转导与疾病	155
第十一章 细胞增殖	156
第一节 细胞分裂	156
第二节 细胞周期	163
第三节 细胞周期调控	166
第四节 细胞分裂与医学	171
第十二章 细胞分化	174
第一节 细胞分化基本概念	174
第二节 细胞分化机制	175
第三节 细胞分化影响因素	176
第四节 细胞分化与肿瘤细胞	177
第十三章 细胞衰老与死亡	180
第一节 细胞衰老	180
第二节 细胞死亡	182
第十四章 干细胞	189
第一节 干细胞的生物学特征	189
第二节 胚胎干细胞	191
第三节 成体干细胞	192
第四节 干细胞与医学	194
第十五章 细胞工程	196

第一节 细胞融合	196
第二节 B 细胞杂交瘤和单克隆抗体	197
第三节 基因转移	198
第四节 细胞工程的应用	200
主要参考文献	203
索引	204

第二节 细胞生物学发展简史

从人类发现细胞至今已有 300 多年的历史。细胞生物学的形成和发展经历了漫长的过程,随着技术手段的创新和理论上的突破,细胞生物学学科逐渐形成并迅速发展。根据其发展历程,可分为四个时期,即细胞学说的建立、细胞学经典时期、实验细胞学时期和细胞生物学的形成。

一、细胞学说的建立

1665 年,英国的物理学家胡克(Hooke)用自制的显微镜观察了软木及一些其他植物组织薄片,发表了《显微图谱》(*Micrographia*)一书,描述了软木是由许多蜂窝状的小室组成,将其称为细胞——cell(小室之意,由拉丁文 *cellulae* 演变而来)。实际上,胡克在软木组织中所看到的仅是植物死细胞的细胞壁。真正观察到活细胞的是荷兰学者列文虎克(Leeuwen Hoek),他于 1667 年用自制的高倍放大镜,观察了许多动植物的活细胞与原生动物,在鲑鱼的血液发现了红细胞。1831 年,布朗(Brown)在兰科植物的叶片表皮细胞中发现了细胞核。1835 年,迪雅尔丹(Dujardin)在低等动物根足虫和多孔虫的细胞内首次发现了透明的胶状物质,称之为“肉样质”(sarcodermis)。1836 年,瓦郎丁(Valentin)在结缔组织细胞核内发现了核仁。

继细胞被发现之后,学者们利用显微镜技术对细胞的形态学进行了不断的研究,虽然有不少科学家曾对细胞提出不同的解释,但对于细胞存在的意义和作用没有做出理论性的总结概括。直到 19 世纪 30 年代,两位德国人相继发表了两篇论文,使得“细胞学说”(cell theory)得以建立。1838 年,德国植物学家施莱登(Schleiden)发表了《植物发生论》,指出细胞是构成植物的基本单位。1839 年,德国动物学家施旺(Schwann)发表了《关于动植物的结构和生长的一致性的显微研究》一文,指出动植物都是细胞的集合体。两人共同提出:“一切生物,从单细胞生物到高等动物和植物都是由细胞组成的;细胞是生物形态结构和功能活动的基本单位”,最初的细胞学说只有这两条。1858 年,德国医生和病理学家魏尔肖(Virchow)提出“一切细胞只能来自原来的细胞”的论点,对细胞学说进行了补充,第三条为:“所有的细胞来自于已有细胞”。此外,他还提出机体的一切病理表现都基于细胞的损伤,从而奠定了细胞病理学的基础,他的这些观点是对细胞学说的重要补充。恩格斯将细胞学说誉为 19 世纪的三大发现之一。

二、细胞学经典时期

19 世纪中叶到 20 世纪初期是细胞学的经典时期,这一时期的细胞学得到蓬勃发展,研究特点是应用固定和染色技术,在光学显微镜下观察细胞的形态结构和细胞的分裂活动。

1841 年,雷马克(Remak)在观察鸡胚的血球细胞时,发现了细胞的直接分裂;1880 年,弗莱明(Flemming)在动物细胞中发现了间接分裂。1882 年弗莱明把直接分

裂称为无丝分裂 (amitosis), 间接分裂称为有丝分裂 (mitosis)。范·贝内登 (Van Beneden) 于 1883 年、施特拉斯布格 (Strasburger) 于 1886 年又分别在动、植物细胞中发现了减数分裂 (meiosis)。

1845 年, 雨果·冯·莫尔 (Hugo von Mohl) 提出了原生质理论, 认为有机体的组织单位是一小团原生质, 这种物质在有机体中是相似的。1880 年, 汉斯坦 (Hanstein) 提出“原生质体” (protoplast) 概念, 认为细胞是由细胞膜包围的一团原生质, 原生质分化为细胞核和细胞质。

随着固定和染色技术的提高, 人们得以观察并发现了几种重要的细胞器。1883 年, 范·贝内登 (Van Beneden) 和博费里 (Boveri) 观察细胞分裂时, 发现了中心体; 1894 年, 奥尔特曼 (Altmann) 发现了线粒体; 1898 年, 高尔基 (Golgi) 发现了高尔基体。

三、实验细胞学时期

20 世纪初期到 20 世纪中叶为实验细胞学阶段, 这一阶段的细胞学研究不再只着重于形态结构的观察, 而是采用了实验手段研究细胞学的问题, 即从形态结构的观察深入到生理功能、生物化学及遗传发育机制的研究。新技术和新方法的采用, 使得细胞学与其他学科相互渗透, 从而逐渐形成一些分支学科。

1900 年, 孟德尔 (Mendel) 遗传法则被重新发现; 1902 年, 博维里 (Boveri) 和萨顿 (Sutton) 提出了“染色体遗传理论”, 把染色体的行为同孟德尔的遗传因子联系起来。1910 年, 根据大量的实验材料, 摩尔根 (Morgan) 证明了遗传因子位于染色体上, 并提出了基因学说, 1926 年摩尔根的《基因论》出版, 从而使细胞学与遗传学相结合, 奠定了细胞遗传学的基础。

1909 年, 哈里森 (Harrison) 用淋巴液成功地培养神经细胞, 1912 年卡雷尔 (Carrel) 建立了组织培养技术, 开辟了活细胞生理、生化研究的直观条件。1921 年, 福尔根 (Feulgen) 首创核染色法显示了细胞核 DNA; 1940 年布勒歇 (Brachet) 利用昂纳 (Unna) 染色液显示胞质中 RNA, 提出了核酸与细胞生命活动的关系, 开始了组织化学、酶化学、放射性核素示踪核酸、蛋白质、糖原和脂类在细胞内定位的研究时代; 卡斯帕尔森 (Caspersen) 用紫外分光光度计测定细胞中 DNA 含量, 首次提出细胞核 DNA 含量恒定和蛋白质合成可能与 RNA 有关的论断。

1933 年, 德国人卢斯卡 (Ruska) 设计制造了第一台电子显微镜, 放大倍数可达几十万倍以上, 开创了亚显微结构研究时代。由此, 许多学者用电镜技术观察细胞, 发现了内质网、质膜、核膜、叶绿体、高尔基体、线粒体、核糖体和溶酶体等。

20 世纪 40 年代后, 电子显微镜的应用使细胞研究深入到亚显微层次, 逐渐把结构和功能统一起来。

四、细胞生物学的形成

从 20 世纪 50 年代开始, 人们逐步开展了从分子水平探讨细胞的各种生命活动的研究工作。这方面的研究成果对细胞生物学的形成和发展起到了巨大的推动作用。随着电

子显微镜技术的建立与发展,对细胞除进行超微结构观察外,也逐步深入到结构与功能相结合的探索,同时应用生物化学与生物物理学手段对细胞的大分子进行分析,细胞学发展成为细胞生物学。

20 世纪中叶,分子生物学蓬勃发展。1944 年,艾弗里(Avery)等在微生物的转化实验中证明了 DNA 为遗传物质。1953 年沃森(Watson)和克里克(Crick)等用 X 线衍射技术解读了 DNA 分子的三维结构(双螺旋结构),奠定了分子生物学的基础。1958 年,克里克(Crick)在这一基础上总结出中心法则,梅塞尔森(Meselson)等用放射性核素标记法证明 DNA 是半保留复制,揭开了生命遗传信息传递的方向和途径。1961 年,尼伦堡(Nirenberg)和马泰(Mathaei)等根据核糖核酸实验获得的结果,确定了每一种氨基酸的“密码”;同年,雅各布(Jacob)和莫诺(Monod)提出了操纵子学说。

随着从分子水平对细胞生命活动机制进行研究,逐渐积累了相应的成果,“分子生物学”学科兴起并发展起来。分子生物学是研究生物大分子,特别是核酸和蛋白质的结构与功能的学科。分子生物学渗透到细胞学各领域,使细胞的形态结构和生理功能研究深入到分子水平,20 世纪 60 年代形成了从分子水平、亚细胞水平和细胞整体水平探讨细胞生命活动的学科,即细胞生物学。

1965 年,De Robertis 的《普通细胞学》改为《细胞生物学》,标志细胞生物学学科的建立;1976 年在美国波士顿召开第一届国际细胞生物学会议,标志着细胞生物学的兴起。近年来,细胞生物学在分子水平上的研究取得了迅速发展,细胞生物学发展为细胞分子生物学(cell and molecular biology)。

第三节 细胞生物学与医学

细胞生物学是研究生命活动基本规律的学科,不仅包括综合性的新兴基础理论,而且与生产实践紧密联系。细胞生物学对研究人体的结构与功能、正常与病变都有着理论与实际的意义。医学是以人体为对象,研究人体生老病死的机制,研究疾病的发生、发展及转归的规律,从而对疾病进行诊断、治疗和预防。细胞生物学研究的各项成果、课题与医学的理论和实践密切相关。

一、细胞生物学是现代医学的重要基础理论

医学是生命科学,构成生命系统的结构具有层次性、复杂性和多样性。从最小的细胞开始,到最大的系统生物圈,尽管生命系统复杂多样,大小不同,但它们层层相依,紧密联系,都离不开细胞这一最基本的生命系统。无论是基础医学还是临床医学,都与细胞生物学有着密不可分的关系。

基础医学各个学科,如解剖学、组织胚胎学、生理学、生物化学、免疫学、药理学、病理解剖学和病理生理学都是以细胞为研究基础,细胞生物学的研究内容已经渗透到基础医学的各学科中,成为这些学科发展的基础。学习与掌握与医学有关的细胞生物学基本理论和基本知识,将为医学生习基础医学打下重要的基础。

细胞生物学也是临床医学的重要基础之一。疾病是机体在一定病因的损害性作用下,因自稳调节紊乱而发生的异常生命活动过程。当细胞结构与功能损伤时,导致人体组织、器官结构和功能的损伤,引起疾病的发生。对于疾病的认识、治疗和预防离不开细胞生物学的理论和知识。例如,危害人类生命健康的三种疾病:肿瘤、心血管疾病和感染性疾病。肿瘤是一种细胞病,肿瘤细胞本质上来源于机体正常细胞,由于在细胞分裂的不同阶段受到各种因素的影响,导致其增殖、凋亡、分化和迁移异常,危及机体的整体安全。肿瘤发生是多因素导致的、多阶段、多层次的细胞增生、分化失控事件。又如缺血性心脏病和脑血管病,可能是由于动脉内皮细胞的变化而引起的动脉粥样硬化所致。再如艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS),由 HIV 引起,病毒在 Th 细胞内大量增殖,破坏细胞,影响其他免疫活性细胞乃至整个免疫系统,使人体易患感染性疾病和肿瘤,最终导致死亡。对于这些疾病的认识,必须从细胞生物学入手,深入探索其病因、发病机制、病理变化,找出诊断和治疗方法。由此可见,细胞生物学在现代医学教育中占有重要地位。

二、细胞生物学技术广泛应用于医学实践

细胞生物学技术运用于医学研究中,已经引起了医学工作者的高度重视。近几十年来,在细胞生物学和分子生物学基础上发展出一些生物技术,如生物工程技术。其中,细胞工程技术(cell engineering)是指在细胞水平上进行遗传操作(如细胞融合、核质移植、染色体或基因移植等),按照预定的设计,改变或创造细胞的遗传物质,不仅可能对癌病、遗传病等进行诊断治疗,而且可以为人类生产高效的生物医药产品。例如,能将人的一群相关基因转移到其他生物体内,该生物就能产生具有人体特征的生物分子、细胞、组织和器官,从人源化生物的身上就可获得人可接受移植(不被排斥)的血细胞、肌细胞、神经细胞甚至可得到心脏、肝脏等器官,当然也能获得用于药物生产的人的抗体、血清白蛋白和胰岛素等。再如,干细胞研究。干细胞是具有全能或多能分化潜能的胚胎干细胞,以及存在于成体器官组织中的组织干细胞。这种细胞具有高度的可塑性,在组织修复、疾病的细胞治疗及生殖工程中有潜在应用价值,是生命科学领域最受关注和最具影响力的研究内容之一。由于这些细胞可定向分化、多向分化和诱导分化,可用以修复损伤,再造器官,治疗人类疑难疾病(如糖尿病、老年痴呆、帕金森病、脊髓损伤、白血病、心血管病等)。由于涉及伦理问题,并且用于移植治疗存在免疫排斥反应风险,目前学术界提出胚胎干细胞的来源限定于胚胎发育着床前的囊胚期。并且建议用患者自体干细胞的治疗性克隆以避免异体的免疫排斥反应。分离脐带血干细胞治疗血液病及其他疑难疾病已有初步结果。

近代细胞与分子生物学的研究已经为整个医学科学的理论与实践开拓出以前无法想象的广阔前景。细胞生物学与医学的关系非常密切,它是现代医学的重要基础,其理论与实践的进展必将极大地促进基础医学和临床医学的深入发展。因此,现代医学研究必须学习与掌握细胞生物学的基本理论、基础知识和实验技术方法。

第二章

细胞生物学研究方法

细胞生物学的发展离不开研究技术的进步，新仪器和新技术的出现，推动了细胞生物学的研究。学习和了解细胞生物学研究技术和方法，有助于细胞生物学理论知识的学习，并且为将来从事生命科学研究打下基础。本章简要介绍细胞生物学研究中的几种主要技术方法。

第一节 显微镜技术

细胞的体积微小，结构复杂。一般动物细胞的直径为 $10\sim 20\mu\text{m}$ ，必须借助显微镜才能够进行观察。按照工作原理的不同，显微镜可以分为光学显微镜和电子显微镜两大类。前者以可见光为光源，后者以电子束为光源，分别用于细胞显微结构和亚显微结构的研究。

一、光学显微镜

(一) 普通光学显微镜

普通光学显微镜 (light microscope) 是光学显微镜中最基本的一种，由三部分构成：①照明系统，包括光源和聚光器；②光学放大系统，由两组玻璃透镜物镜和目镜组成，是显微镜的主体；③机械装置系统，用于固定材料、照明及光学放大系统的准确调控。普通光镜的最大分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ，最大放大倍数为 1000 倍。在光学显微镜下所观察到的细胞结构，称为光镜结构或显微结构 (microscope structure) (图 2-1)。

普通光学显微镜主要用于染色标本的观察，所观察的既可以是细胞也可以是组织块。如果是细胞，需要制作成爬片或涂片，然后染色封片进行观察；如果是组织块，需要进行固定、脱水、透明、包埋、切片和染色，封片后置于显微镜下观察。最常用的染色法是苏木精 (hematoxylin)

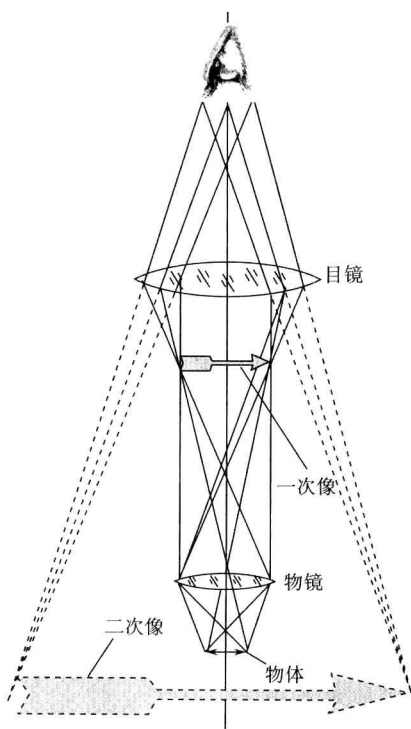


图 2-1 光学显微镜成像原理

和伊红 (eosin) 染色 (HE 染色法)。

(二) 荧光显微镜

荧光显微镜 (fluorescence microscope) 是以紫外光为光源, 用以照射物体使之发出荧光, 在显微镜下观察其形状及所在位置的一种显微镜技术。其基本结构包括: 光源装置、滤色系统 (包括激发光的滤光片和阻断滤光片) 和光学系统。光源采用高压汞灯, 光源发出的光通过激发滤光片后, 可以产生特定波长的激发光 (如紫外光或蓝紫光); 一定波长的激发光照射所观察的标本, 可激发细胞内的荧光物质, 使之发出一定波长的荧光; 再通过物镜、目镜的放大及目镜中阻挡滤光片对发射光过滤, 在显微镜下观察到细胞内的荧光。由于不同荧光物质所需激发光的波长是不同的, 在实际应用中, 应根据所要观察的荧光物质的不同, 选择适当的激发滤光片和阻挡滤光片 (图 2-2)。

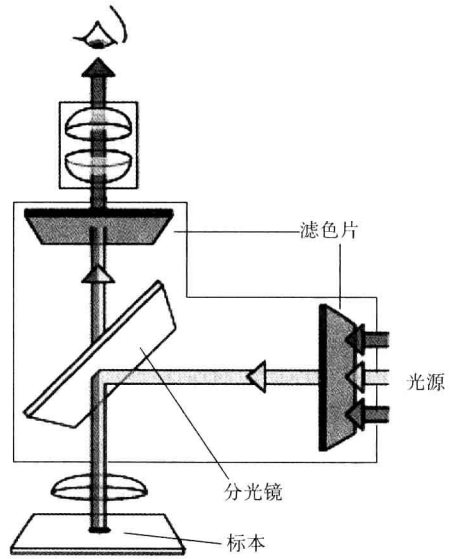


图 2-2 荧光显微镜成像原理

细胞内的某些天然物质如叶绿素, 经紫外线照射后, 能发出红色的荧光, 这称为自发荧光; 标本本身不发荧光, 经荧光染料处理后, 标本中对荧光染料有选择性吸收的部分受激发发出荧光, 这称为次生荧光。常用的荧光染料包括: 荧光素、吖啶橙、罗丹明、Texas 红、DAPI 和 Hoechst 等。目前被使用的荧光染料种类很多, 包括传统的有机荧光染料及近年发展起来的无机荧光染料等。可以采用多重荧光染色对同一细胞内的不同结构进行同时显示, 如采用三种不同抗体标示细胞内的不同抗原, 然后用带有不同荧光的二抗孵育, 在荧光显微镜下即可见到三种不同的颜色显示三种结构。此外, 通过向细胞内转染荧光蛋白的方法, 如转染 GFP (绿色荧光蛋白) 等, 可以实现对某些特定分子在细胞中的活动进行示踪和定位。

(三) 相差显微镜

相差显微镜 (phase contrast microscope) 能够将标本对光的衍射差异转变成明、暗差异, 从而能够用肉眼区分难以用普通光镜观察的未经染色的样品 (如活细胞)。光波有振幅 (亮度)、波长 (颜色) 及相位 (指在某一时间上光的波动所能达到的位置) 的不同。当光通过物体时, 如波长和振幅发生变化, 人们的眼睛才能观察到; 而活细胞和未经染色的生物标本, 因细胞各部分微细结构的折射率和厚度略有不同, 光波通过时, 波长和振幅并不发生变化, 仅相位有变化 (相应发生的差异即相差), 而这种微小的变化, 人眼是无法加以鉴别的, 故在普通显微镜下难以观察到。相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位, 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, 以增大其明暗的反差。因此可用以观察活细胞或未染色

标本。

相差显微镜广泛用于观察活细胞及未经染色的生物标本的形态结构。观察培养细胞常采用倒置相差显微镜，与普通相差显微镜不同，倒置相差显微镜的光源和聚光器装在载物台下方，便于观察在培养瓶中贴壁生长的活细胞，故习惯上称其为倒置相差显微镜（inverted phase contrast microscope）。倒置相差显微镜特别适宜观察体外培养活细胞的结构和活动，如再装配上影像记录设备，则可在镜下拍摄记录体外培养细胞的生长状态或活动状况，如细胞分裂、细胞迁移运动，以及细胞内部结构或组分在细胞各种生命活动中的动态过程。

（四）暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark field microscope）是利用光学上的丁达尔现象，在普通光镜中央加一块遮光板，光源以一定角度倾斜照射到样品。照明光线不直接进入物镜，只有经过标本的散射光进入，视野的背景是黑暗的，被检物体为亮点。

暗视野显微镜观察物体的轮廓，适于观察活细胞内的细胞核、线粒体、液体介质中的细菌和真菌等。一般暗视野显微镜虽看不清物体的细微结构，但却可分辨 $0.004\mu\text{m}$ 以上的微粒的存在和运动，这是普通显微镜（最大的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ）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。

（五）共聚焦激光扫描显微镜

共聚焦激光扫描显微镜（confocal laser scanning microscope）用激光作扫描光源，逐点、逐行、逐面快速扫描成像，扫描的激光与荧光收集共用一个物镜，物镜的焦点即扫描激光的聚焦点，也是瞬时成像点。利用放置在光源后的照明针孔和放置在检测器前的探测针孔实现点照明和点探测，来自光源的光通过照明针孔发射出的光聚焦在样品焦平面的某个点上，该点所发射的荧光成像在探测针孔上，该点以外的任何发射光均被探测针孔阻挡，从而产生一幅完整的共焦图像。其最大特点是可以对所观察物体（如细胞）进行不同焦距平面扫描，从而进行光学切片，而且可以将系列连续的光学切片通过计算机软件整合为具有三维特征的空间影像（图 2-3）。

共聚焦激光扫描显微镜已广泛用于生物医学研究的各个领域，可以完成包括荧光检测、细胞结构三维重建、细胞内离子浓度测定等多种实验。

二、电子显微镜

电子显微镜（electron microscope）利用电子束作为“光源”实现成像，电子束带负电荷，由电子枪内的灯丝发射，具有光的波动性、可折射性。电镜的分辨率达到 0.2nm ，在电镜下才能观察到的结构称为亚显微结构（submicroscopic structure）或超微结构（ultramicroscopic structure；ultrastructure）。电镜主要有两大类：透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM），利用电子穿透样品成像而设计，反映样品内部的状况；扫描电子显微镜（scanning electron microscopy, SEM），利用二次电子成像设计，反映样品的表面立体形貌。

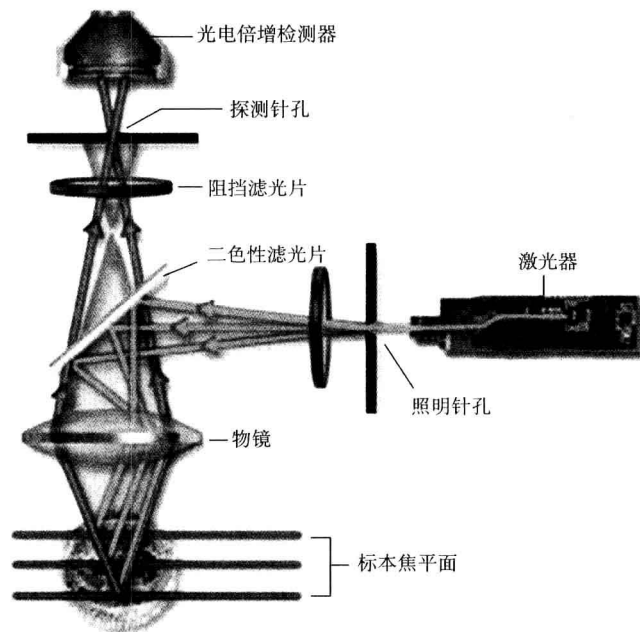


图 2-3 共聚焦激光扫描显微镜成像原理

（一）透射电子显微镜

透射电子显微镜（透射电镜）是用电子枪发射的高速电子束（电子流）代替光镜照明的光线，用特殊的电极或磁极（静电透镜和磁透镜）代替光镜的聚光镜、目镜和物镜，从而达到聚焦和放大目的。当电子束射落到切片上时，随细胞成分的密度及吸附重金属程度不同而发生相应的电子散射，由透射电子射落到胶片上而成像（图 2-4）。由于电子波的波长远远短于可见光波，所以，电镜的分辨率远远高于光镜的分辨率，电镜的放大倍数可达近百万。透射电镜的电子穿透能力较弱，被观察的样品需做成超薄切片，厚度要求为 40~50nm。透射电镜主要用于观察和研究细胞内部超微结构。

（二）扫描电子显微镜

扫描电子显微镜（扫描电镜）用来观察标本表面结构。成像方式与透射电镜不同，扫描电镜用电子束照射在标本后产生的二次电子在

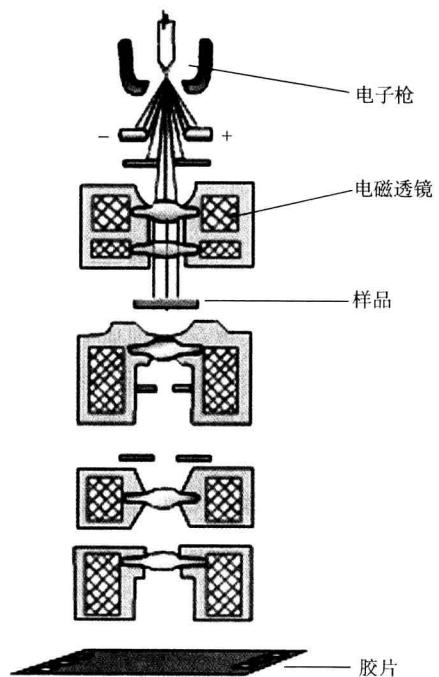


图 2-4 透射电镜成像原理

荧光屏上成像。扫描电镜的分辨率不及透射电镜，一般在 3nm 左右，但其景深大，形成的图像立体感很强。样品制备简单，不需做超薄切片。一般样品只需经固定、脱水、干燥后，在其表面喷镀一层金属膜后（镀膜可增加二次电子，以产生鲜明的影像）即可进行观察。扫描电镜广泛应用于观察标本表面精细的三维形态结构。

（三）电镜的样品制备

1. 透射电子显微镜制片技术

其基本要求是：①尽可能保持材料的结构和某些化学成分生活时的状态；②材料的厚度一般不宜超过 1000nm，组织和细胞必须制成薄切片，以获得较好的分辨率和足够的反差；③采用各种手段，如电子染色、投影、负染色等来提高生物样品散射电子的能力，以获得反差较好的图像。

样品制备的方法随生物材料的类型及研究目的而各有不同。对生物组织和细胞等，一般多用超薄切片技术，将大尺寸材料制成适当大小的超薄切片，并且利用电子染色、细胞化学、免疫标记及放射自显影等方法显示各种超微结构、各种化学物质的部位及其变化。对生物大分子（蛋白质、核酸）、细菌、病毒和分离的细胞器等颗粒材料，常用投影、负染色等技术以提高反差，显示颗粒的形态和微细结构。此外还有以冷冻固定为基础的冷冻断裂——冰冻蚀刻、冷冻置换、冷冻干燥等技术。

2. 扫描电子显微镜样品制备技术

扫描电镜以观察样品的表面形态为主。扫描电镜样品的制备，必须满足以下要求：①保持完好的组织和细胞形态；②充分暴露欲观察的部位；③具有良好的导电性和较高的二次电子产额；④保持充分干燥的状态。

某些含水量低且不易变形的生物材料，可以不经固定和干燥而在较低加速电压下直接观察，如动物毛发、昆虫、植物种子、花粉等，但图像质量差，而且观察和拍摄照片时须尽可能迅速。对大多数的生物材料，则应首先采用化学或物理方法固定，脱水和干燥，然后喷镀碳与金属以提高材料的导电性和二次电子产额。

第二节 细胞的分离和培养

细胞培养技术也称为细胞克隆技术。不论对于整个生物工程技术，还是其中之一生物克隆技术来说，细胞培养都是一个必不可少的过程，细胞培养本身就是细胞的大规模克隆。细胞培养，包括微生物细胞的培养，细胞培养技术可以由一个细胞经过大量培养成为简单的单细胞或极少分化的多细胞，这是克隆技术必不可少的环节，而且细胞培养本身就是细胞的克隆。通过细胞培养得到大量的细胞或其代谢产物。因为生物产品都是从细胞得来，所以可以说细胞培养技术是生物技术中最核心、最基础的技术。

一、细胞的分离

大多数情况下，细胞都是以组织的形式存在，而组织中总是有多种细胞同时存在。