

生物科学
生物技术
系 列

CELL MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十一五”规划教材

细胞分子生物学

聂俊 杨冬芝 杨晶 编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

细胞分子生物学

聂俊 杨冬芝 杨晶 编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞分子生物学/聂俊, 杨冬芝, 杨晶编: —北京: 化学工业出版社, 2009. 1

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-04512-6

I. 细… II. ①聂…②杨…③杨… III. 细胞生物学: 分子生物学-高等学校-教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 002455 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 张春娥

责任校对: 郑捷

装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 14½ 彩插 4 字数 382 千字 2009 年 5 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

前 言

细胞分子生物学主要是在分子水平研究细胞生命活动的基本规律，是生命科学前沿学科之一。它与多门前沿生命学科如基因组学、蛋白质组学等不断交叉与整合，相互借鉴，研究内容不断拓展和深入，研究进展日新月异。

2004 年，北京化工大学经教育部批准设立了国内首个“生物功能材料”本科专业并在全国范围内招生，该专业将《细胞分子生物学》定为必修专业课，并于 2006 年开始该课程的教学。由于该专业设立在材料专业，此专业学生的化学基础较强但生物学基础相对较弱，而且学生在本科期间的专业大量涉及材料学，因而通过两年的教学摸索，我们体会到迫切需要一本合适的《细胞分子生物学》教科书或参考书，其在一定程度上能满足以材料学为主的生物功能材料系本科生的教学要求。因此，本书在编写过程中注重从化学及分子的角度理解细胞的结构、形态及功能。其内容涉及细胞结构，基因表达，细胞增殖、分化及凋亡，细胞信号转导，癌症，以及细胞工程等方面。

本书在编写过程中得到了北京化工大学生物功能材料系诸位老师的大力帮助，同时也要感谢北京化工大学生物功能材料系 2004 届、2005 届的本科生，他们对本书的初稿提出大量的意见和建议。藉此书出版之际，特向他们表示深深的谢意。

在本书的编辑和出版过程中，得到了化学工业出版社有关编辑的大力帮助，在此表示感谢！本书配套课件可在化学工业出版社教学资源网 www.cipedu.com.cn 下载。

鉴于编者的水平有限及编写时间上的仓促，本书难免存在这样或那样的问题，敬请同行、读者批评赐教，以便更正。

编者

2009 年 2 月

目 录

第一章 序言	1
第二章 细胞生物学研究方法	5
第一节 光学显微镜	5
一、紫外线显微镜	5
二、荧光显微镜	5
三、暗视野显微镜	6
四、相差显微镜	6
五、微分干涉差显微镜	7
六、激光扫描共聚焦显微镜	7
七、倒置显微镜	7
第二节 电子显微镜技术	7
一、透射电镜	8
二、扫描电镜	8
三、扫描隧道显微镜	8
第三节 细胞组分的分析方法	9
一、超强离心分离	9
二、细胞内核酸、蛋白质、脂类、糖类 等成分的显色方法	9
三、免疫荧光抗体技术	9
四、同位素放射自显影技术	10
第四节 细胞培养、细胞工程与转基因 技术	10
一、细胞培养	10
二、细胞工程	11
三、转基因技术	11
第三章 生命的化学基础	12
第一节 生命的元素组成	12
第二节 生命的食物——糖类	13
一、糖类的概念与分类	13
二、单糖	15
三、寡糖	16
四、多糖	17
第三节 生命活动的主要承担者——蛋 白质	18
一、蛋白质分子的组成成分	19
二、氨基酸	19
三、肽键与肽	22
四、多肽	23
五、蛋白质	24
第四节 遗传信息的携带者——核酸	29
一、核酸的基本组成物质	29
二、核酸的一级结构	35
三、核酸的二级结构	37
第五节 生物膜的构筑材料——脂类	48
一、概述	48
二、单纯脂	49
三、复合脂类	51
四、非皂化脂	52
五、结合脂类	53
第四章 细胞基础	56
第一节 细胞的基本概念	56
第二节 细胞的基本共性	57
一、细胞作为生命属性的共同特征	57
二、细胞必定具备的物质结构	57
第三节 病毒与细胞的关系	59
一、病毒的基本知识	59
二、病毒的增殖	61
三、病毒的分类与种类	61
第四节 原核细胞与古核细胞	62
一、支原体	62
二、细菌	62
三、蓝藻	65
四、古核细胞——古细菌	65
五、原核细胞与真核细胞的比较	66

第五节 细胞的概况	66		
第五章 细胞膜及细胞表面	69		
第一节 细胞膜与细胞表面的特殊结构	69	三、通信连接	87
一、细胞膜的结构模型	69	四、细胞表面的黏连分子	89
二、质膜的化学组成	74	第三节 细胞外被与细胞外基质	90
三、质膜的功能	79	一、细胞外被	90
第二节 细胞连接	85	二、细胞外基质	90
一、封闭连接	85	三、植物细胞壁	93
二、锚定连接	86	四、红细胞膜结构	95
第六章 内膜系统	98		
第一节 内质网与核糖体	98	一、溶酶体	102
一、形态结构	98	二、微体	105
二、内质网的主要功能	99	三、液泡	105
三、内质网与基因表达的调控	100	第四节 细胞骨架与细胞运动	106
第二节 高尔基体与细胞分泌	100	一、细胞质骨架	106
一、形态结构	100	二、核基质	114
二、高尔基体的功能	101	三、核纤层	116
第三节 溶酶体、微体与液泡	102		
第七章 线粒体与氧化磷酸化	117		
第一节 线粒体	117	一、糖酵解	121
一、线粒体的化学组成及定位	117	二、乙酰辅酶 A 的形成	121
二、线粒体的半自主性	118	三、三羧酸循环	121
三、线粒体的增殖	119	四、电子传递和氧化磷酸化	121
第二节 线粒体的功能——生物氧化	121		
第八章 叶绿体与光合作用	124		
一、叶绿体的形状、大小、数目及分布	124	三、化学组成	125
二、叶绿体的超微结构	124	四、叶绿体的功能——光合作用	125
第九章 核糖体	129		
第一节 核糖体的类型与结构	129	第二节 多聚核糖体与蛋白质的合成	133
一、核糖体的基本类型与成分	129	一、多聚核糖体	133
二、核糖体的结构	129	二、蛋白质的合成	134
三、原核细胞与真核细胞核糖体比较	130	三、RNA 在生命起源中的地位及其演化过程	135
四、核糖体蛋白质与 rRNA 的功能分析	131		
第十章 细胞核与遗传	136		
一、细胞核形态、大小、数目及分布	136	一、核被膜	137
二、细胞核的结构	136	二、核孔	138
第一节 核被膜与核孔复合体	137	第二节 染色体	141

一、概念及化学组成	141	二、核仁的主要功能	147
二、染色质的基本结构单位——核小体	142	三、核仁在细胞周期中的动态变化	147
三、染色体包装的结构模型	143	第四节 核基质	147
四、常染色质和异染色质	144	一、概念	147
五、两种巨大染色体	145	二、组成	147
第三节 核仁	146	三、功能	148
一、核仁超微结构	146	四、染色体骨架	148
第十一章 细胞增殖、分化与死亡	149		
第一节 细胞的增殖周期	149	五、CDK 激酶和 CDK 激酶抑制剂	157
一、着丝点	150	第四节 细胞分化	157
二、细胞质分裂	150	一、细胞分化的基本概念	158
三、特异的细胞周期	151	二、影响细胞分化的因素	159
第二节 有丝分裂	151	三、影响细胞分化的机制及细胞分化的应用	160
一、有丝分裂过程	151	第五节 细胞衰老	164
二、与有丝分裂相关的亚细胞结构	153	一、Hayflick 常数	164
三、有丝分裂中染色体的运动机制	154	二、衰老细胞结构和生理的变化	164
第三节 减数分裂	154	三、细胞衰老的分子机制	165
一、减数分裂前间期	154	第六节 细胞凋亡与细胞坏死	167
二、减数分裂过程	154	一、细胞程序性死亡	167
三、细胞周期的调控	156	二、细胞凋亡的分子机制	168
四、周期蛋白	157		
第十二章 癌症	170		
第一节 癌细胞的基本特征	170	二、染色体缺失造成细胞坏死，导致癌细胞无限分裂	175
一、形态特征	170	第四节 肿瘤	176
二、生理特征	170	一、肿瘤的概念	176
第二节 癌基因与抑癌基因	173	二、癌症	177
一、癌基因	173	三、癌细胞的特征	177
二、抑癌基因	173	四、环境中的致癌因子	177
第三节 细胞癌变的研究	175	五、癌症的治疗	179
一、多基因突变可导致肿瘤发生	175		
第十三章 细胞的基因表达	180		
一、基因表达调控基本概念与原理	180	四、真核基因表达调控的特点	182
二、操纵子的结构与功能	181	五、真核基因转录调控元件及激活机制	184
三、真核基因组结构特点	182		
第十四章 细胞信号转导系统	186		
第一节 细胞信号转导的内容	186	二、通过细胞表面受体介导的信号跨膜传递	191
一、细胞信号的种类	187	三、胞内受体	198
二、细胞间通信的类型	187	四、磷脂酶和磷脂酰肌醇激酶的信号转导通路	200
第二节 受体	188		
一、受体的基本概念和特征	188		

五、核受体	201		
第十五章 细胞工程	204		
第一节 染色体工程	204	第三节 细胞质工程	207
一、动物细胞的染色体工程	204	一、细胞质工程的方法	208
二、植物细胞的染色体工程	204	二、细胞质工程的应用	209
第二节 染色体组工程	206	第四节 细胞融合工程	210
一、染色体组工程的方法	206	一、细胞融合的方法	210
二、染色体组工程的应用	207	二、细胞融合工程的应用	211
第十六章 生命起源	212		
第一节 关于生命起源的争论	212	第三节 达尔文的生物进化论	215
一、生命起源的化学进化过程	212	第四节 达尔文之后的进化论	216
二、生命起源的基本条件	213	第五节 生物多样性及生态系统的基本	
三、原始的生命	213	结构	216
四、关于生命起源的几种假说	213	第六节 自然的启示	218
第二节 化学演化说	214		
附录 常见细胞分子生物学名词及其释义	221		
参考文献	222		

第一章 序 言

细胞生物学是运用近代物理学和化学的技术成就，以及分子生物学的方法、概念，在细胞水平上研究生命活动的科学，其核心问题是有关遗传与发育的问题。细胞生物学与其说是一个学科，不如说是一个领域。这可以从两个方面来理解：一是它的核心问题——将发育与遗传在细胞水平结合起来，不局限于一个学科的范围；二是它和许多学科都有交叉，难分界限。

分子生物学是从分子水平研究生物大分子的结构与功能，从而阐明生命现象本质的科学。其在分子水平上揭示了生命世界基本结构和生命活动根本规律的高度一致，揭示了生命现象的本质。分子生物学的概念和观点已经渗入到基础和应用生物学的每一个分支领域，带动了整个生物学的发展，使之提高到一个崭新的水平。

细胞是生物形态结构和生命活动的基本单位。由于大多数细胞的直径在 $30\mu\text{m}$ 以下，大大超出了人类肉眼的直接观察范围 ($200\mu\text{m}$)，必须借助于科学仪器才能观察。

英国物理学家罗伯特·虎克 (Robert Hooke) (1635—1703) 在 1665 年首次用显微镜 (40~140 倍) 观察到了栓皮栎的软木切片 (cork) 的蜂窝状结构 (图 1-1) 并称之为小孔 (pore) 或小室 (cell)，实际上 Hooke 观察到的是植物细胞死亡后留下来的细胞空腔，是一个死细胞。尽管如此，Hooke 的工作还是使生物学的研究进入了微观领域。

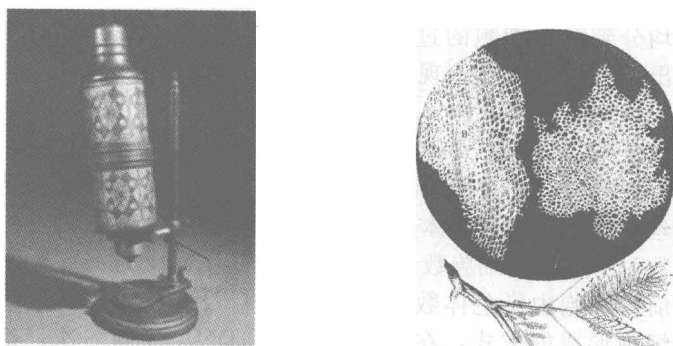


图 1-1 Hooke 利用自制的显微镜观察到的木栓薄片组织的图像

与 Hooke 同时代的荷兰科学家列文·虎克 (Anton van Leeuwenhoek) (1632—1723) 一生制作了 400 多架显微镜，放大倍数一般在 50~200 倍之间，1676 年他通过显微镜发现了池塘中的原生动物，1683 年又发现了牙垢中的细菌，并把它们描绘下来，寄给当时欧洲的学术中心——伦敦皇家自然知识促进会，该学会将他 30 余封信件译成英文并汇编成《哲学汇报 (1673—1724)》《Philosophical Transaction (1673—1724)》。Leeuwenhoek 制作的显微镜放大倍数最高可达 500，分辨率为 $1.0\mu\text{m}$ ，他在细胞发现方面的贡献是巨大的。

德国植物学家施莱登 (Matthias Schleiden) 在 1838 年通过自己的观察得出结论——“所有植物体都是由细胞组合而成的”。一年以后，德国动物学家施旺 (Theodor Schwann)

得出结论——“所有动物由细胞构成”，并在总结前人的研究成果基础上提出了“一切生物体都是由细胞组成”的细胞学说 (cell theory)。“细胞学说”提出不久，即被迅速推广到许多领域的研究中，这对当时的生物学发展起到了巨大的促进和指导作用。如施罗德 (Sichold) 等通过对原生生物的研究证明，不仅动植物，而且原生动物也是由细胞组成的，它们是只含一个细胞的动物，能独立地进行全部生命活动。艾伯特可里克 (Albert Kolliker) 通过研究胚胎，证明了生物的个体发育过程就是细胞不断繁殖和分化的连续过程。1958 年德国病理学家魏尔肖 (Rudolf Virchow) 明确提出“细胞来源于细胞 (omnis cellula e cellula)”的概念，于是早期的细胞学说包含了三部分内容：①细胞是生命的最小结构单位；②所有生物都是由一个或多个细胞组成的；③细胞只能由细胞分裂而来。

自细胞学说创立后，19 世纪是细胞研究的繁荣期。自从迪雅尔丹在原生动物细胞内发现了十分均匀、有弹性、能收缩的胶状物质后，就称它们为“肉样质”。其后于 1840 年普金耶 (Pukinje) 在动物细胞、1846 年冯·莫尔在植物细胞中也看到了“肉样质”的东西，并将其命名为“原生质”。1861 年舒尔策 (Max Schultze) 认为动物细胞内的“肉样质”和植物细胞内的“原生质”具有同样的意义，由此提出了原生质理论，即有机体的组织单位是一小团原生质，这种物质在一般有机体中是相似的。至此，细胞的含义就和最初发现时大不相同了。于是汉森 (Hanstein, 1880) 提出了“原生质体 (protoplast)”的概念，但由于 cell 一词沿用已久，因此人们仍采用旧名。

1841 年雷马克 (Remak) 在观察鸡胚血细胞时发现了细胞的直接分裂，其后 1870 年费莱明 (Flemming) 在动物细胞、施特拉斯伯格 (Strasburger) 在植物细胞中发现了有丝分裂，并证实有丝分裂的实质是核内丝状物 (染色体) 的形成及其向两个子细胞的平均分配。1883 年范·贝内登 (Van Beneden) 在动物细胞、1886 年施特拉斯伯格在植物细胞中又发现了减数分裂，至此细胞分裂的主要类型都已被人类发现。

1875 年 O. Hertwing 发现了受精过程中卵、精两个核的融合现象。1873 年 Schneider 把细胞核纵裂为二并均分到两个细胞的过程称为核分裂 (Karyokinesis)，1880 年 Fleming 根据分裂过程中核内出现染色质丝这一现象，把它称为有丝分裂 (mitosis)，1885 年 Rabl 证实两代细胞染色体保持完整不变。1905 年 J. Farmer 和 J. Moore 把有性生殖生物的生殖细胞通过分裂使染色体数减半的分裂方式称为减数分裂 (meiosis)。有丝分裂和减数分裂的相同点有：首先，有丝分裂和减数分裂都是细胞增殖的方式；其次，有丝分裂和减数第二次分裂过程相同，都是着丝点断裂，染色单体分开后进入两个子细胞的过程，在这个过程中，分裂前后细胞中染色体数目不变，而细胞数量增加一倍。其不同点为：有丝分裂是生物体体细胞增殖的方式，分裂前后细胞中染色体数目、DNA 数目没有发生变化，只是细胞数量增加；而减数分裂是生殖细胞形成的方式，在分裂过程中，DNA 复制一次，细胞连续分裂两次，从而使得细胞中的染色体数目和 DNA 数目都减少一半。

与此同时，一些重要的细胞器也相继被发现，如 1883 年范·贝内登 (Van Beneden) 和博费里 (Bovri) 发现了中心体，1894 年阿尔特曼 (Altmann)、1897 年本达 (Benda) 发现了线粒体，1898 年高尔基 (Golgi) 发现了高尔基体。

19 世纪末，细胞遗传学迅速发展。1883 年 W. Roux 提出染色体是遗传单位的携带者；1884 年 Hertwing 和 Strasburger 提出细胞核含有控制遗传性的因子，1885 年 Weismann 提出种质学说，主张种质完全不同于体细胞，是遗传性的唯一携带者，可以代代相传。1865 年 Mendel 研究豌豆杂交试验后提出遗传单位控制性状发育。1902 年 W. A. Cannon 提出遗传的染色体学说，认为遗传因子在染色体上；1909 年 W. L. Johannsen 将遗传因子定义为基因 (gene)。1889 年 R. Altman 测定了核酸 (nucleic acid) 的化学组成，1994 年 R. Feulgen 设计了专门对 DNA 染色的方法。

1892 年 Hertwing 的《细胞学》(Cytology) 的出版标志着生物学分支的开始, 1896 年美国细胞学家 E. B. Wilson 发表了《细胞与发育和遗传》(The cell in development and heredity) 专著, 这是第一部系统介绍细胞学的著作。Wilson 在 1925 年该书的第三版中绘制了细胞模式图(图 1-2), 该图一直沿用到 20 世纪 50 年代。

自 1939 年 Siemens 公司生产世界上第一台电子显微镜以来, 由于电子显微镜及其数量的飞速发展, 使其放大倍数达一百万倍, 观察的分辨率可达零点几纳米, 并因此而带动了细胞学的快速发展, 科学家们相继观察到了多种细胞器的超微结构, 如内质网 (Porter、Claude 和 Fullan, 1945)、叶绿体 (Porter、Granick, 1947)、高尔基体 (Dalton 和 Felix Sjostrand, 1950)、溶酶体 (de Duve, 1952)、线粒体 (Palade、Poster 和 Sjostrand, 1950)、核糖体 (Palade, 1953)、核膜 (Callan 和 Tomlin, 1950) 以及单位膜 (Robertson, 1958) 等。1961 年, J. Brachet 在《活细胞》(Living Cell) 专著中根据电镜观察结果, 绘制了详细细胞模式图(图 1-3), 该图相比于 Wilson 的模式图大为改观, 它不仅描绘了细胞的超微结构, 还反映了细胞活动的动态观点。

随着科学家们对细胞结构的日益认识, 细胞研究也从普通的细胞学向高层次分子水

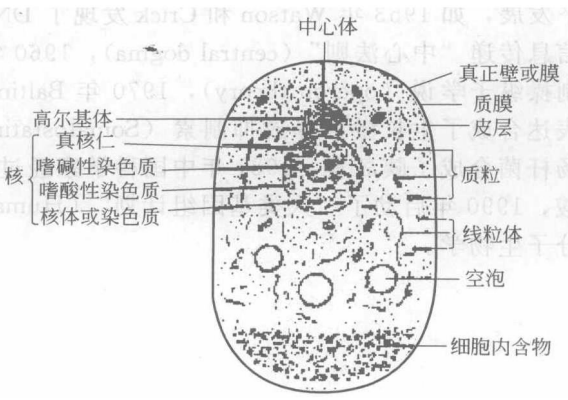


图 1-2 1925 年 E. B. Wilson 所绘制的细胞模式图
该细胞模式图反映了在光学显微镜时代对细胞观察的成就

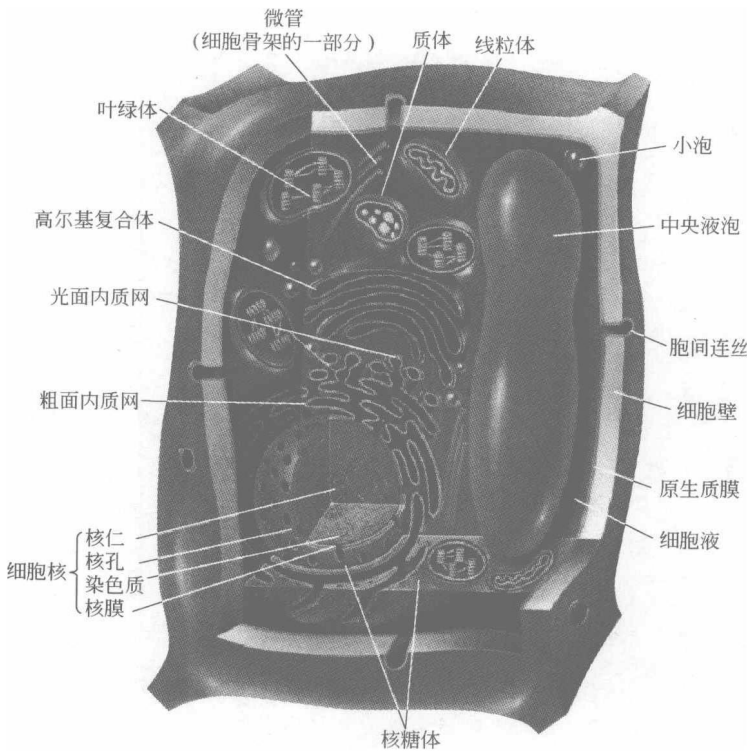


图 1-3 细胞模式图

平发展，如 1953 年 Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构，1958 年 Crick 提出了遗传信息传递“中心法则”（central dogma），1960 年 Jacob 和 Monod 提出了蛋白质合成调控机制操纵子学说（operon theory），1970 年 Baltimore 发现了反转录酶，1977 年底通过基因表达合成了生长激素释放抑制素（Somatostatin），1979 年通过把小鼠胰岛素基因引入大肠杆菌合成了胰岛素，1981 年中国科学家经过 13 年的努力合成了酵母丙氨酸转移核糖核酸，1990 年启动了“人类基因组计划”（Human Genome Project）等，并由此发展出细胞分子生物学。

第二章 细胞生物学研究方法

由于细胞非常小，因而研究其无不与新技术及新设备相关联，本章主要介绍常用细胞研究的手段及方法。

第一节 光学显微镜

光学显微镜 (optical microscope) 是观察细胞的主要工具之一，主要由光源、聚光器、物镜、目镜等组成。显微镜的成像清晰度与显微镜的分辨率有关，分辨率是指区分两个质点间的最小距离，分辨率的大小又与波长和镜口率相关，可通过式 $D=0.61\lambda/NA$ 计算，其中 D 为分辨率； λ 为波长； NA 为镜口率，也称数值孔径 (numerical aperture)。由此式可见，为得到高分辨率必须缩短波长、增加镜口率。而镜口率是由公式 $NA=n\sin(\alpha/2)$ 计算的，其中 n 为物镜与标本间的折射率； α 为镜口角。由于镜口角总是小于 180° ，所以 $\sin(\alpha/2)$ 的最大值必然小于 1，制作透镜的玻璃折射率一般为 $1.65\sim 1.78$ ，以溴萘为介质时，镜口率可达 1.6，最短的可见光波长 $\lambda=450\text{nm}$ ，由此计算分辨率 $D=171\text{nm}$ 。当两质点间的距离低于 171nm 时，此观察无效。为进一步提高显微镜的观察能力，除普通光学显微镜外，科学家们又制造出了多种改良显微镜，介绍如下。

一、紫外线显微镜

由于紫外光的波长低于可见光，因而提高了显微镜的分辨率。但其制作成本大大增加，因为要使用石英、萤石、碳酸锂等特种玻璃来制作。

二、荧光显微镜

荧光显微镜 (fluorescence microscope) (图 2-1) 的原理是利用波长较短的蓝紫光或紫外光照射样本，使样本中分子、原子的外层电子自低能态轨道跃迁，即从较低能态进入较高能态，电子在这种高能状态下不稳定，在很短时间后，电子即会返回到原来的稳态轨道，这种回归释放出的能量就会产生荧光。该荧光波长较原来激发光的波长要长，且比较柔和。从而可通过观察物体所发出的荧光来观察物体的形状及其所在位置。

荧光有两种，一种是自发荧光，它是细胞内某些天然物质经紫外光照射后发出的光，如植物叶绿体中的叶绿素就能发出血红色的荧光；另一种是诱发荧光，诱发荧光是将荧光染料物质（荧光色素，如酸性品红、甲基绿、中性红、吖啶

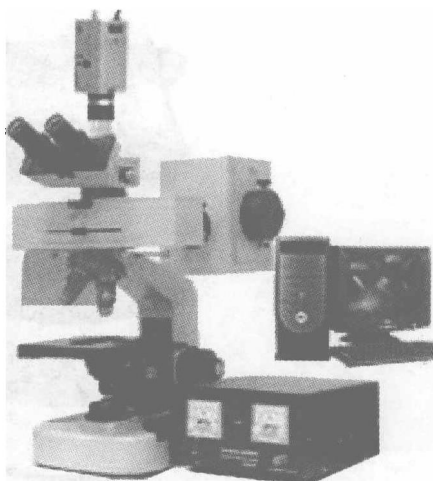


图 2-1 荧光显微镜

橙、吖啶黄、刚果红等)加入细胞中,经过染色后产生的荧光。标本经固定后,用吖啶橙染色,可使细胞内的RNA发出红色荧光,使DNA发出绿色荧光。荧光染色剂的浓度很低,不毒害细胞,可进行活体观察。荧光显微镜和普通显微镜的区别为:①照明方式通常为落射式,即光源通过物镜投射于样品上;②光源为紫外光,波长较短,分辨力高于普通显微镜;有两个特殊的滤光片,光源前的用于滤除可见光,目镜和物镜之间的用于滤除紫外线,用以保护人眼。

三、暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)与普通显微镜的区别在于装配了一套特殊的聚光器——暗视场聚光器。暗视场聚光器的中央有一较大的圆形遮光板,外周是一圈透光光阑,当光线射入时,由于遮光板作用,挡住了进入视野中的直射光,所以看到的视野一片黑暗,但遮光板外圈光阑可射入环状光束,这些光束经聚光镜抛物面反射汇聚于样品处,并斜向照明样品,使被照明的样品发出反射光和散射光而进入物镜,从而使得看到的物体是明亮的,而背景则是暗的。该法虽看不清微粒的结构,但可分辨出 $0.004\mu\text{m}$ ($4\sim 200\text{nm}$)小微粒的存在和运动。

用暗视野显微镜可观察鞭毛、纤毛、精子、细胞核、细胞壁、线粒体及液泡等的结构。

四、相差显微镜

当光线通过微小颗粒时,由于颗粒本身的密度及折射率不同,会产生差异。颗粒密度大时,光的滞留时间长,相当于走过了更长的距离,由此就会产生光程差,光程差的相位不同,又导致相位差,通过相差显微镜(phase contrast microscope,图2-2)可将相位差转变成振幅差,振幅差可表现出明暗不同的效果,由此得出深浅不同的影像。与普通光镜不同,相差显微镜有两个相差板:一个在聚光器中,称为环状光阑,环状光阑上具有黑白相间的环纹,中间为环状透明部分,其余为不透明的涂漆部分;另一个相差板在物镜中,称为相板,相板也分为两部分环区,中间为半透明圆环区,其余为吸光区,该区镀有Ag、Cr可吸收光线,降低光强度。由于两个相板的作用,可使进入显微镜的光发生不同程度的偏斜,并扩大

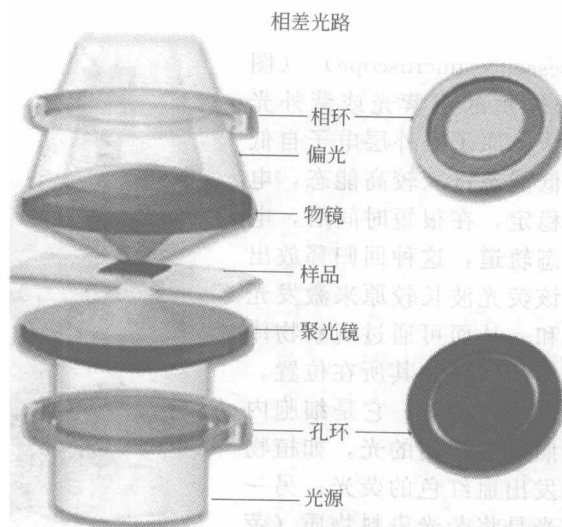


图 2-2 相差显微镜示意图

未偏斜及偏斜光相位与振幅的差别,最后经未偏斜及偏斜光发生相互叠加和/或干涉现象,从而表现出可见的明暗图像。

因其可将透过标本的光程差转变成振幅差,提高对比度并得到清晰图像,该显微镜特别适合观察活细胞和活组织。

五、微分干涉差显微镜

此显微镜是对相差显微镜的改进,其观察样品可以更厚,并显现三维立体投影影像。

六、激光扫描共聚焦显微镜

这是一种新型的荧光显微镜,它以激光作为扫描光源,通过扫描装置对样品进行扫描而获得二维荧光影像。该技术的关键在于在物镜后焦平面处安装了一个小孔光阑,该小孔只允许来自焦平面的光通过并成像,而将焦平面以外的散射光挡住,这样就使得所成的图像异常清楚,它的分辨率比普通荧光镜的分辨率提高了 1.4~1.7 倍。

七、倒置显微镜

倒置显微镜 (inverted microscope, 图 2-3) 的组成与普通显微镜相同,不同的是倒置显微镜的光源在载物台上、物镜在载物台下,与其他显微镜的结构位置刚好相反,故称倒置显微镜。

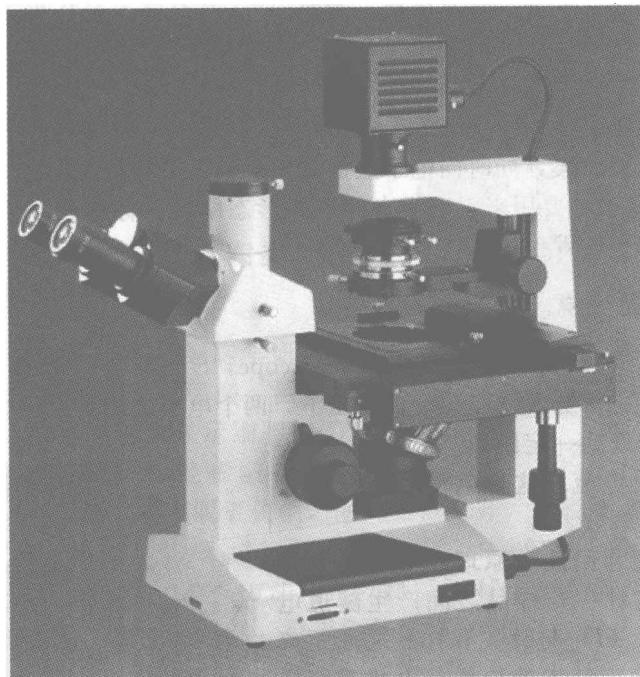


图 2-3 倒置显微镜

第二节 电子显微镜技术

目前,电子显微技术已成为研究机体微细结构的重要手段。常用的有透射电镜、扫描电镜等。电子显微镜与光学显微镜的比较见表 2-1。

表 2-1 电子显微镜与光学显微镜的比较

项目	电子显微镜	光学显微镜
电源	高压加速电子束 50~100kV	可见光或紫外线激光
波长	0.038~0.054Å, 很短	3900~7200Å, 很长
分辨率	理论值 0.018Å, 实际值 1~2Å	2000Å
放大倍数	50~100 万倍	1000~1600 倍
标本制作	超薄切片, 厚度 50nm	石蜡切片: 3~12μm, 冰冻切片: 10~50μm
透镜系统	电磁透镜	玻璃透镜
通路	真空中	空气中
样品置于	火棉网胶膜或透明塑胶膜上	玻片上

注: 1Å=0.1nm。

一、透射电镜

透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 与普通显微镜原理相同, 但 TEM 是使用电子束作光源、用磁场作透镜。电子显微镜的放大倍数可达百万倍, 但由于电子不能透过玻璃, 因而电子显微镜的标本须制成 0.05μm 的超薄切片。

其成像过程是:

电子枪→电子→高压电子束→样品→电子散射及反射→不同密度的电子束→物镜→荧光屏→观察

超薄切片技术为:

样品→固定→包埋→切片→样品染色→观察

二、扫描电镜

扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 是将标本表面上发射的次级电子用带有正电荷的栅极收集, 同时向电子显像管发送信号, 在荧光屏上显示出与电子束同步的立体扫描图像。SEM 主要用来观察标本的表面形态结构。标本在固定、脱水后还要喷以重金属从而保证次电子的发射。

三、扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope, STM) (图 2-4) 主要原理是利用了量子力学中的隧道效应。隧道效应是指在低压下, 两个电极之间具有很大阻抗, 可阻止电流通过; 当两电极之间近到一定距离 (100nm 之内) 时, 电极之间可产生电流, 这种电流称为隧道电流, 该现象即为隧道效应。

扫描隧道显微镜利用这种原理, 使原子针尖扫描样品表面时, 在针尖与样品之间产生隧道电流, 并根据隧道电流 (I) 与针尖和样品之间距离 (d) 的函数关系来确定针尖的位置, 由此确定样品的表面形状。

扫描隧道显微镜的主要优点为: ①分辨率高, ②可在多种条件下工作, ③测量的破坏性小, ④扫描速度快。

在电子显微镜技术中涉及两种比较重要的制样方法, 即负染法和冷冻蚀刻电镜技术。

(1) 负染法 负染法与一般染色方法相反,

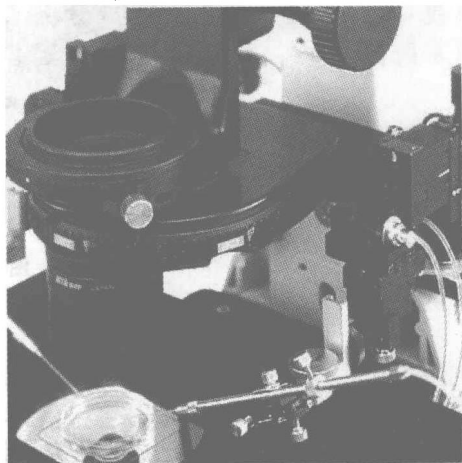


图 2-4 扫描隧道显微镜

其背景暗、样品亮。该法适宜对较小分散的样品染色,如核糖体、病毒、蛋白质等。观察前先将颗粒或纤维样品分散在小铜网上,然后用重金属盐,如磷钨酸、醋酸双氧铀、柠檬酸铅等染色,随即吸去多余的染色液。干燥后残余染料将沉积在样品周围及样品凹陷、空隙处呈深色,样品本身呈浅色。

(2) 冷冻蚀刻电镜技术 冷冻蚀刻 (freeze-etching) 电镜技术是一种专门观察样品外表面的投影复型技术。制作方法是先将样品在液氮温度冷冻,冷冻速度为 $1000^{\circ}\text{C}/\text{s}$,然后用刀将其断开,此时断面通常是沿着生物膜的脂双分子层之间形成,如在细胞器表面或膜结构等处形成一个凹凸不平的断面。随后稍升高温度,使样品中冰在真空中升华。这样,细胞内外凡空隙处或含游离水较多的地方将下陷,使其他一些结构显示出来,并进一步增强了断面的浮雕效果。再用炭垂直于断面真空喷镀,形成一个连续的炭膜,用铂、金等金属进行倾斜喷镀,以形成对应于凹凸的电子反差,最后用强力消化液把样品腐蚀掉,剩下一层炭膜及其上的重金属颗粒,该膜称为复型膜。

第三节 细胞组分的分析方法

一、超速离心分离

离心是研究细胞成分及生物大分子的手段之一,一般转速为 $10000\sim 25000\text{r}/\text{min}$ 的离心机称为高速离心机,转速超过 $25000\text{r}/\text{min}$ 的为超速离心机 (图 2-5),自 1924 年瑞典科学家 Svedberg 发明第一台分析超速离心机到现在,其最高转速可达 $80000\text{r}/\text{min}$ 。科学家们利用超速离心技术对细胞亚结构如细胞核、线粒体、高尔基体、溶酶体及生物大分子进行了系统详细的研究。



图 2-5 超速离心机

二、细胞内核酸、蛋白质、脂类、糖类 等成分的显色方法

该法属于细胞化学内容,是细胞学研究的传统领域,有关这方面的实验资料很多。例如传统的 Feulgen 染色法,可以专一地显示细胞中 DNA 的存在部位。其原理为:DNA 经稀酸 ($1\text{mol}/\text{L}$ HCl) 水解后,其上的嘌呤碱基和脱氧核糖之间的键被打开,使脱氧核糖的一端形成游离的醛基,这些醛基在原位又发生 Schill 试剂反应,形成紫红色的化合物,由此使细胞内含有 DNA 的部位全都呈现紫红色。利用该方法,可以观察 DNA、染色体及细胞核等。

进行细胞染色的染料多为重金属盐,要求染色必须有专一性。

三、免疫荧光抗体技术

抗体是脊椎动物为防御感染所产生的免疫球蛋白。它们在蛋白质中是非常独特的一类,自然界中有数百万种不同类型的抗体,而每种类型的抗体都有一个与抗原结合的特异部位,通过这个部位的结合,就能特异地辨认出诱导它产生的抗原分子。这些抗原包括蛋白质、细菌、病毒、花粉、食物、动物血清等。

免疫荧光抗体技术 (immunofluorescence technique) 就是用荧光染料标记抗体,然后在荧光显微镜下通过荧光的部位和强度确定特异分子的分布和数量。免疫荧光技术的关键是: