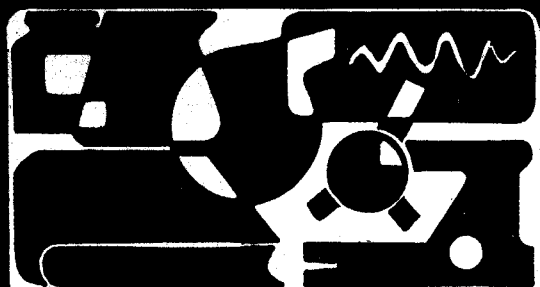


高等医药院校教材 一

细胞生物学 研究方法与技术

● 刘鼎新 吕证宝 主编



北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

细胞生物学研究方法与技术

刘鼎新 吕证宝 主编

责任编辑：彭学敏

*

北 京 医 科 大 学
中国协和医科大学 联合出版社出版

(社址：北京医科大学院内，100083)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经销
北京医科大学印刷厂印刷

*

开本：787×1092 1/32 印张：9.625 字数：208 千字
1990年6月第一版 1990年6月第一次印刷 印数：1—4500册
ISBN7—81034—023—9/R·24 定价：1.95 元

编写者（按姓氏拼音顺序排列）

- 董彦 北京医科大学细胞生物学教研室
何其华 北京医科大学分析计算中心细胞分析室
刘鼎新 北京医科大学细胞生物学教研室
吕证宝 北京医科大学细胞生物学教研室
彭学敏 北京医科大学细胞生物学教研室
苏雅娴 北京医科大学细胞生物学教研室
谭曾鲁 北京医科大学细胞生物学教研室
陶家平 北京医科大学分析计算中心细胞分析室
许三多 北京医科大学细胞生物学教研室
杨景山 北京医科大学组织胚胎学教研室
周柔丽 北京医科大学细胞生物学教研室
-

内 容 提 要

本书简明扼要地介绍了细胞生物中的各种光学显微术、显微摄影术、显微分光与显微荧光光度术、流式细胞术、图像处理术、电子显微镜技术、电子探针X线显微分析、细胞与亚细胞结构的分离、组织培养、单克隆抗体技术、细胞超微标记示踪技术、低温生物学技术、放射自显影术、细胞动力学检查、原位核酸分子杂交技术等原理、方法与应用。本书可供医学院校、生物专业的师生，以及医务人员参考。

序 言

本教研室自1984年开设“细胞生物学研究方法与技术”课程以来，深受研究生和大学生的欢迎。这门课程的开设不仅有助于细胞生物学的学习，而且也为他们研究课题中的方法选择和正确掌握提供了方便。为了教学需要和便于读者参考，几年内对原讲义几经修改，最后整理成为现稿出版。

现代细胞生物学发展很快，所用技术、方法繁多，本书则扼要介绍其中较为基本、重要、在国内易于实现者，而未概括细胞生物学所有的技术，以为引路之用，故仍保留教材特色。由于课时所限和避免课程间的重复以及尽量减少篇幅，对本校已开设的专门技术课程，在本书内只是加以简介。

本书编写和出版过程中，得到北京医科大学、基础医学院、细胞生物学教研室各级领导的大力支持；细胞生物学教研室的肖军军、刘刚、马守兴等几位教师编写了部分早期的讲义，庄惠歆与安林两位教师为书稿的整理做了许多工作，在此一并感谢。

细胞生物学研究方法与技术涉及诸多领域，由于编者能力有限，错误或不当之处敬请专家与读者指正，以利今后改进！

刘鼎新 吕证宝

1990.1

目 录

第 一 章	光学显微镜术	(1)
第一节	显微镜的构造和原理.....	(2)
第二节	各种显微镜.....	(15)
第 二 章	显微摄影术	(25)
第一节	成像原理与常用的装置.....	(25)
第二节	感光材料及其暗室加工.....	(27)
第三节	黑白片显微摄影中滤色镜的使用.....	(31)
第四节	彩色片显微摄影中滤色镜的使用.....	(32)
第 三 章	显微分光与显微荧光光度术	(33)
第一节	显微分光光度术.....	(33)
第二节	显微荧光光度术.....	(40)
第三节	扫描隧道显微镜.....	(52)
第 四 章	流式细胞术及其应用	(56)
第 五 章	图像处理技术及其应用	(60)
第 六 章	电子显微镜的原理、技术与应用	(71)
第一节	电子显微镜的基本原理.....	(71)
第二节	电子显微镜技术与方法.....	(79)
第三节	电子显微镜在医学、生物学 中的应用.....	(86)
第四节	电子显微镜图像的立体定量分析法.....	(91)
第 七 章	电子探针X 线显微分析仪	(105)

第一节	工作原理·····	(106)
第二节	结构·····	(113)
第三节	特点·····	(116)
第四节	在生物学中的应用·····	(118)
第五节	样品制备·····	(120)
第 八 章	细胞与亚细胞结构的分离·····	(122)
第一节	从动物组织游离细胞·····	(122)
第二节	细胞与细胞器的分离·····	(137)
第 九 章	组织培养·····	(156)
第一节	发展概况·····	(156)
第二节	基本原理和方法·····	(158)
第三节	常用的培养方法·····	(162)
第四节	体外培养材料的取材方法与 原代培养 (以恶性肿瘤材料为例) ·····	(167)
第五节	细胞系或细胞株的建立·····	(171)
第六节	培养细胞的生长与增殖·····	(175)
第七节	培养细胞的保存、贮藏和运输·····	(180)
第八节	基本设备和试剂·····	(182)
第 十 章	单克隆抗体技术·····	(191)
第一节	引言·····	(191)
第二节	基本原理·····	(191)
第三节	产生与克隆杂交瘤的步骤·····	(192)
第十一章	细胞超微标记示踪技术·····	(205)
第一节	超微标记示踪技术的分类及评价·····	(205)
第二节	铁蛋白标记技术·····	(207)
第三节	金微粒 (胶体金) 标记技术·····	(209)

第十二章	低温生物学技术	(217)
第一节	低温生物学.....	(217)
第二节	低温生物学技术.....	(218)
第十三章	放射自显影术	(226)
第一节	基本知识与原理.....	(228)
第二节	方法与结果分析.....	(240)
第十四章	细胞动力学的研究方法与应用	(252)
第一节	放射自显影法.....	(254)
第二节	流式细胞计法.....	(260)
第三节	应用概况.....	(262)
第十五章	原位核酸分子杂交技术	(264)
第十六章	细胞（组织）化学和免疫细胞化学	(273)
第一节	细胞化学.....	(273)
第二节	免疫细胞化学.....	(283)
参考文献		(289)

第一章 光学显微术

显微镜 (Microscope) 问世已久, 已有400年历史。

1590年前后, 荷兰的 Hans 父子创造了放大 10 倍的原始显微镜。1609~1625 年意大利的伽利略 (Galileo) 发明了望远镜, 并用它观察微小物体。十七世纪以后英国物理学家虎克 (Robbert Hooke) 和意大利的解剖学家马尔皮基 (Marcollo Malpighi) 创制了性能较好的显微镜, 分别用于植物学和医学研究。

1695 年荷兰人惠更斯 (Huygens) 设计和制出惠更斯目镜, 18~19世纪、英、法、德、意等国的科学家创造了反射镜、消色差透镜和物镜校正环等部件, 使显微镜更加完善。

1870 年德国的阿伯 (Abbe) 提出显微镜理论, 1872 年又发明透镜的油浸法, 使显微镜有了突出的改进。19 世纪末, 阿伯与蔡司 (Zeiss) 合作制造了更高级显微镜, 其放大率达2000倍左右。

随着科学技术与光学理论的发展, 近代已制成显微分光光度计 (Microspectrophotometer)。这是一种显微镜与分光装置联合的仪器, 既能观察细胞内的微细结构, 又能定性、定量和定位地测定细胞内各种组成成分, 并能对细胞和组织内的某些化学反应进行定量测量。

此外, 还有具有其它功能的各种显微镜, 如相差显微镜, 暗视野显微镜、偏光显微镜、扫描隧道显微镜等。

第一节 显微镜的构造和原理

一、显微镜的分类与构造

根据构造和使用目的不同分为单式显微镜 (magnifier) 和复式显微镜 (compound microscope)。前者由一块或几块透镜组成, 放大倍数不高, 如放大镜和平台解剖镜等。后者构造复杂, 由目镜、物镜和聚光器组成, 放大倍数较高, 如双筒显微镜等。此外, 相差、暗视野、偏光、荧光等各种显微镜都是在后者的基础上制成的。

显微镜的构造分为光学系统和机械系统。前者是显微镜的主要部件, 决定着光学性能, 但仍需后者精密的配合, 才能有效地发挥作用。

(一) 光学系统 (Light System)

由物镜 (Objective)、目镜 (Ocular, eyepiece) 和照明装置 (Illuminating apparatus) 组成。前两种部件使所观察的物体在显微镜中成像; 后者则能改变入射光的性质和强度。

1. 物镜

物镜由凸凹透镜组成, 在物镜下端、靠近标本的称前透镜; 在物镜上端的称后透镜。在物镜的外表面标注放大倍数和数值孔径以及镜筒长度和盖玻片的厚度等。如“40”表示放大倍数, “0.70”为数值孔径, “160”即为镜筒长,

“0.17”是所要求的盖玻片厚度。如标有 apo (或apochromatic) 则表示为复消色差物镜; aplan (或aplanchromatic) 为常消色差物镜。

物镜的功能有二：一为产生物体的第一次倒立实像；二为放大作用。

物镜的分类有三种方法：

按物镜与标本之间的介质不同分三类。

(1) 干燥系物镜 (Dry system)：指观察标本时在物镜与标本之间以空气作为介质，其折射率的 1。

(2) 油浸系物镜 (Oil immersion system)：标本与物镜之间以松柏油作为介质，其折射率为 1.515 (图 1.1)，

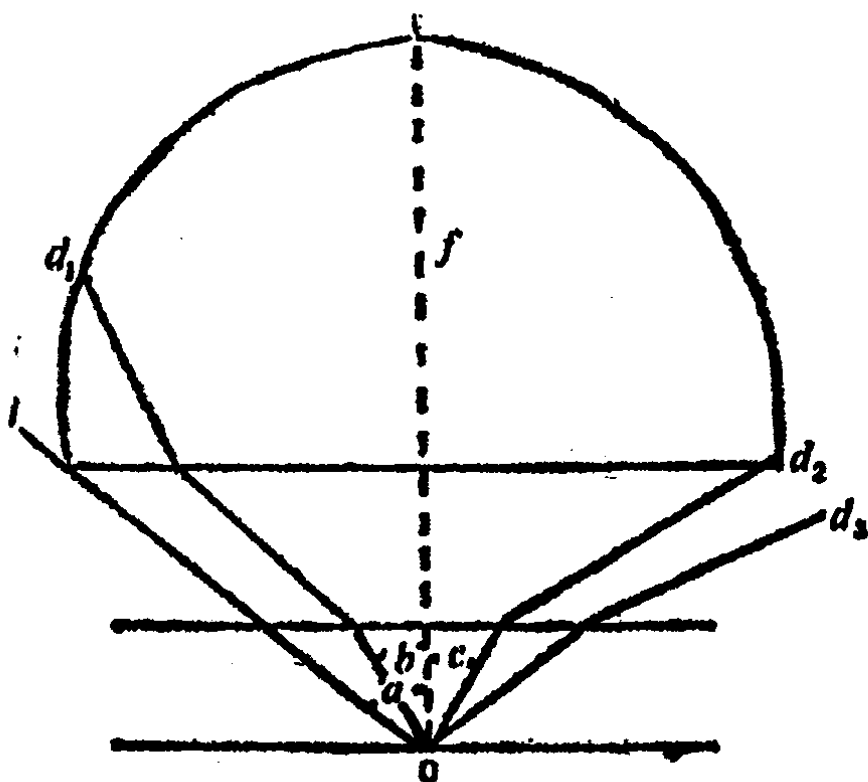


图 1.1 干燥系与油浸系物镜的比较。

油浸系：从物体 O 折射的光束 i 直接射入物镜。

干燥系：油浸和干燥系的镜口角均为 a ，从 O 折射光束 d_1 形成的角 $b < a$ ，视野暗。干燥系下最大的角是由 d_2 形成的 c ，如角度 c 再大， d_3 则不能射入透镜 f 。

(3) 水浸系物镜 (Water immersion system) : 标本与物镜之间以水为介质, 其折射率为1.333。

物镜按放大倍数不同可分四类: 低倍物镜的放大倍数为1~5倍, 中倍物镜放大5~65倍, 高倍物镜放大倍数为65~95倍, 油浸高倍物镜放大90~100倍。通常以“X”代表倍数。

物镜按所校正的误差不同可分为三类:

(1) 消色差物镜 (achromatic objective), 能消除球差和色差两种误差。

球面像差和色差的产生可用物理学原理解释。透镜的表面呈球面者, 则使通过透镜中轴所成的像和通过其边缘所成的像不重合, 因为通过透镜边缘的光线比通过透镜中轴的光线偏折大, 因而所有光线不能相交在一点所造成。用几块凸凹透镜组合则能消除此种球差。

由多色光束组成的光源, 由于各色光的折射率不同, 波长长的红光折射率小而波长短的紫光折射率大。前者距透镜中心较远的地方成像, 后者离透镜中心近的地方成像, 使像不能重合。这种误差称为色差。用色散能力不同而折射率相同的材料做成凸凹透镜则可校正色差。

用钙、硅酸钾制作凸透镜, 用铝、硅酸钾制作凹透镜, 两者粘合起来则组成消色差物镜。

(2) 复消色差物镜 (apochromatic objective), 能消除球差与色差。

用石英玻璃和氟化钙结晶制成的凸凹透镜可组成复消色差物镜。它能使红、绿、蓝多种光会聚在同一点, 因而消除了多种色差和球差。

(3) 平场物镜 (plan objective), 主要消除场曲也称像面弯曲。

像面弯曲是由于远离主光轴的物体造成的像差, 又称为像散。当光线通过物体又通过透镜后成一个光锥, 在此路程上呈第一次和第二次像, 在两次像处光锥呈带状, 一为水平位, 一为垂直位。在两带之间又有一模糊圆。这称为像散。当焦点不准时就把物体看成为两条正交的线。

在消色差物镜和复消色差物镜中加有一块厚的弯月形透镜而组成平场物镜, 可用来校正和消除像面弯曲使像平坦。

2. 目镜

目镜由平凸透镜组成。在目镜下端者为场镜 (field lens), 在目镜上端者为接目镜 (eye lens)。目镜的外表面上标有放大倍数, 如“5”、“6.3”或“10”等。

目镜的功能有二: 一是将物镜所成的倒立实像变成正立的虚像, 二是将像再放大4至16倍。

目镜按不同的用途分为四类

(1) 惠更斯目镜 (Huygenian eyepiece)

此种目镜上的场镜和接目镜均由平凸透镜组成, 凸面向下。它必须与消色差物镜配合使用。目镜的放大倍数与接目镜的直径和目镜筒长有关。直径越小、筒长越短者, 放大倍数越大。此种目镜在生物学显微镜中经常采用。

(2) 补偿目镜 (Compensating Ocular)

此种目镜主要校正红光的色差, 必须与复消色差物镜配合使用。因为复消色差物镜使蓝像大于红像, 而补偿目镜则使红像大于蓝像, 正好起了补偿作用。

(3) 平场目镜 (complanatic eyepiece)

这种种目镜能纠正像面弯曲，视野平广，常与平场物镜配合使用，用于显微镜摄影。

(4) 广角目镜 (wide angle eyepiece)

这种透镜厚度大，而其焦点不变，光折射以后能扩大景物的视野。常配合消色差物镜使用。

3. 照明装置 (illuminating apparatus)

照明装置也称聚光器，包括聚光镜、光栏和反射镜三个器件。其功能有二，一为改变入射光的性质，即决定吸收哪些光和透过哪些光；二为改变入射光的强度即调节光束大小。

(1) 聚光镜 (Condenser)

聚光镜位于显微镜台下，由1~3块透镜组成。最上边一块是平面透镜。其作用为使平行光会聚在上透镜上方1.25 mm处，以使光线继续射入整个物镜的镜口角，并可得到均匀的亮度。

较好的聚光镜同样能消除球面像差和色差。

为了充分发挥物镜的性能，必须使聚光镜的数值孔径与物镜者一致。

各种专用而有特殊功能的显微镜具备不同的聚光镜，如暗视野显微镜设有暗视野聚光镜，普通双筒显微镜设有明视野聚光镜，相差显微镜下装有转盘聚光镜。

(2) 光栏

装在聚光镜下的光栏是为了控制光束的大小而起调节光的亮度的作用。

虹彩光栏：由多个半月形的薄金属片重叠镶在圆形框架上。各片之间是活动的，可由把手调控。光栏的中心有活动孔，孔的大小可根据需要进行调节。

转盘光栏：也称环状光栏。在一块平板上制备有大小不等的环形孔道。选择不同的孔道可控制光量，以提供不同亮度。每种环孔与相应的物镜对应使用。

(3) 反射镜 (reflection mirror)

反射镜在光栏的下面，是由一面平面和一面凹面组成的双面镜。可向各方向转动和翻转来改变采光的方向。经过平面反射镜的光较弱，而通过凹面反射镜所得到的光强度较大、亮度较高。

4. 光源 (Light Source) 与照明法

(1) 光源：显微镜的照明光源分为天然光源和人工光源。天然光源以通过白云的太阳光最柔和，对人眼无伤害。如果加磨玻璃和滤光片也能起到同样的效果。天然光源的视野亮度与放大倍数成反比，即放大倍数越高则视野越暗。故观察细致的结构、要求放大倍数较高时，多采用人工光源。

人工光源一般都采用低压灯泡所产生的强光，再通过会聚透镜加强光的亮度并使光均匀照射。人工光源可以调节其强弱、位置、照射方向以及与显微镜之间的距离等。人工光源亦应加滤光装置。

人工光源中的弧光灯用于暗示野照明；紫外灯用于紫外显微镜；碘钨灯、氙灯、高压汞灯用于显微荧光分光光度计。

(2) 照明方法：根据光源射出光线的方向又分为透射照明和落射照明。

(1) 透射照明 (Transp asen illumination)

光线从标本下方照来通过标本后成像。

中心照明，照明光束与显微镜的光轴平行，光束宽而均

匀，通过标本进入物镜。

柯勒照明，是一种非平行光照明，视野内的光度均匀，用于高倍和油浸物镜观察。（图1·2）

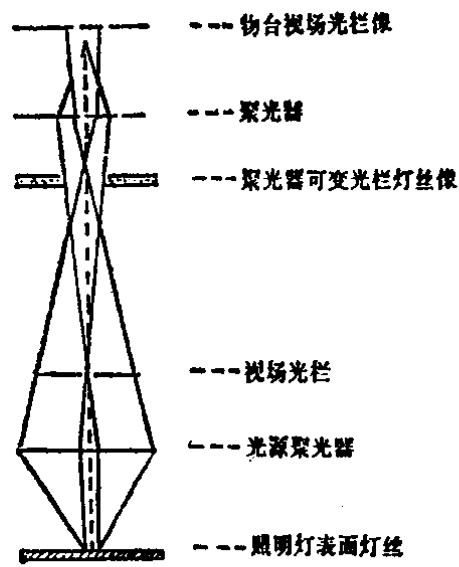


图1·2 柯勒照明

斜射照明，照明光线与光轴形成一定角度，分为明视野斜射照明和暗视野斜射照明，后者的照明光线不进入物镜。

(2) 落射照明

光线从标本上方射入落到物体上。这种照明适用于不透明物体的观察。在生物医学上所用的荧光显微镜和偏光显微镜采用之。

5. 滤光装置

滤光片是用有色玻璃做成的镜片，放在聚光镜的下方，以控制光线的通过。为了减少色差可用它来造成单色光。

不同波长的光其颜色也不一样，可以把可见光分成七种单色光，（红、橙、黄、绿、青、蓝和紫光）。它们的波长依次为700，650，600，550，500，450，400nm。其中红、绿和蓝三种光可组成白光、红与绿呈黄光、红与蓝合为紫光。

滤光片的功能：选择性的吸收某色光或某种波长的光而透过另一些色光或另一些波长的光。这样就产生出单色光而减少色差。滤光片滤过光或透过光时只是对某种光容易通过。颜色越深者吸收某种光的能力越强。蓝色滤片透过蓝光而吸收黄光；红色滤片则透过红光而吸收蓝与绿光。

滤片的分类与用途:

(1) 乳白色滤片: 用于强光光源, 使射来的光亮度降低、光线变柔、不刺激人眼, 对观察细微结构有利。

(2) 蓝色滤片: 用于白热灯光, 吸收其中的黄色光, 使蓝光透过多, 然而青紫也有少量透过。此外还吸收橙红和紫红色光。

(3) 黄色滤片: 使黄色光通过多, 然也通过少许红、橙和绿光。

(4) 绿色滤片: 使绿和黄两色光通过, 尤以绿色者为多。吸收蓝紫光 and 红光。

(5) 红色滤片: 透过红色光最多, 橙黄也能通过一些, 而吸收绿、青、蓝紫几种光。

(6) 中性密度滤片: 对各种波长的光均匀吸收, 因而只减少光强而不影响光谱分布。用于校准仪器和调节照相时的光强。

(7) 防热滤片: 安放在靠光源处吸收光源的热辐射, 使样品不致受热损伤而起保护样品活性的作用。

使用上述各种滤片可以校正光束增加影像的反差, 以更清晰地显示微细结构。

6. 显微镜的光轴

在显微镜的光学系统中, 物镜、目镜和聚光镜与光栏中心形成的直线称为光轴。因目镜是固定的、物镜和聚光镜的位置是可变的, 故必须经常调整方能保证光轴的一致性。

在使用相差和暗视野显微镜时, 聚光镜的中心和光栏的中心必须一致方能进行样品的观察。

物镜与聚光镜两者的光轴必须一致, 聚光镜与物镜的距