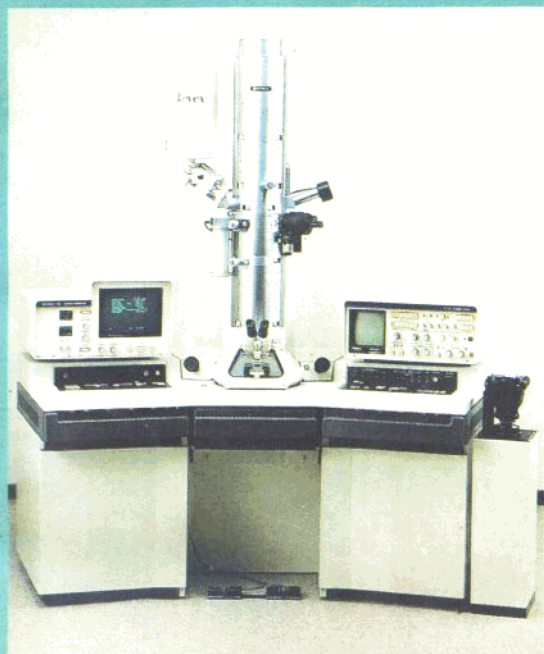


现代细胞生物学技术



徐承水 党本元 主编

青岛海洋大学出版社

参加编写人员(以姓氏笔划为序)

王化庆	王文房	王秋宇	古运德
刘培正	吴 峰	李桂芝	杨俊慧
张洪震	张贵恕	张祥沛	郭承华
郭曙光	夏海武	嵇 庆	薛良义

内 容 提 要

本书综合汇集了时至今日细胞生物学研究中的主要方法和技术。共包括三部分内容:生物工程概论,反映了生物工程这一世界高新技术的现状、应用和展望;细胞生物学近代技术概论,介绍了尖端设备仪器及其在细胞生物学研究中的应用;细胞生物学教学实验,汇总了细胞生物学基础教学的主要实验内容。

该书既可作为大专院校现代细胞生物学技术和普通细胞生物学实验的试用教材,又是从事细胞生物学教学和科研人员的必备工具书。

前 言

众所周知,科学的发展与技术工具的进步是分不开的,每从事一项研究,理想的工具和切实可行的方法是至关重要的。一种新技术的建立,一种新工具的出现,常常会给学科开辟一个新的领域,或给某学科带来根本性变化,这种情况在细胞生物学研究中尤为明显。从细胞生物学 300 多年来的发展史来看,如果没有光学显微镜和光学显微镜技术,就不会有细胞学的诞生,如果没有电子显微镜和电子显微镜技术,同样不会有细胞生物学的兴起。近代细胞生物学的发展更清楚地显示出,每当有重大工具和技术发明时,科学就孕育着重大的飞跃。

随着科学的发展,新技术、新方法层出不穷,形成了细胞生物学领域的一个独立分支学科——现代细胞生物学技术。它是近代物理学和化学与生物学结合和渗透的产物,是能够促进当今生命科学向纵深发展的新技术。就其广义概念而言,包括的领域有:生物工程、分子生物学技术、研究用显微镜技术、电子显微镜技术、波谱学技术(即各种分光光度术)、色谱分析技术、氨基酸分析技术、超速离心技术、同位素应用技术等,甚至包括在这些技术原理基础上派生的普通细胞生物学实验技术。

为全面系统地反映细胞生物学发展到今天的诸多方法技术,我们组织部分高等院校的同行编写了这本《现代细胞生物学技术》,以期对细胞生物学教学和科研工作有所裨益。从知识结构的层次和使用的方便两方面考虑,全书分为三编。第一编,生物工程

概论,旨在反映当今世界这一高新技术领域的现状及应用前景;第二编,细胞生物学近代技术概论,介绍新近发展起来的方法技术和精密仪器设备的应用;第三编,细胞生物学教学实验,则是结合教学大纲和参编院校的实际选编的常规实验,以满足各大专院校细胞生物学实验教学的需要。

本书从构思到问世历经两年之久,参编人员都是多年从事细胞生物学教学和科研的骨干,在搜集大量文献资料的基础上,旁证博引形成整体框架,精雕细琢充实其内容。再经有关专家审核提出修改意见,最后由徐承水统审定稿。所以本书的问世,既有参编人员的辛勤劳动,又包含同行专家的真知灼见,是集体智慧的结晶。青岛海洋大学出版社和济南印刷四厂给予了大力支持和帮助。在此,我们谨向关心、支持我们工作的所有专家、同行,向编写过程中所选用资料的原作(著)者,表示诚挚的谢意!

由于我们编写组成员水平所限,加之时间仓促,书中不当甚至错误之处在所难免,诚恳希望同行专家和广大读者不吝指教,我们深表谢忱。

编 者

1995年1月

目 录

前 言

第一编 生物工程概论

第一章 基因工程

第一节 概述	(2)
一、基因工程的诞生	(2)
二、基因工程的定义	(5)
第二节 基因的结构与功能	(6)
一、基因的基本概念	(6)
二、基因的化学组成	(7)
三、基因的结构与功能	(8)
第三节 基因工程的技术路线	(24)
一、DNA 克隆片段的产生与分离	(24)
二、目的 DNA 与载体 DNA 分子的体外连接	(29)
三、重组子导入受体细胞	(48)
四、重组子的筛选与鉴定	(52)
第四节 基因工程的应用现状及展望	(54)
一、基因工程的应用现状	(54)
二、基因工程的展望	(63)

第二章 细胞工程

第一节 概述	(68)
第二节 细胞学基础知识	(68)

一、细胞是生命活动的基本单位·····	(68)
二、细胞的大小和形状·····	(69)
三、细胞的一般结构·····	(70)
第三节 细胞工程的主要技术路线·····	(73)
一、细胞融合技术·····	(73)
二、细胞拆合技术·····	(86)
三、细胞培养技术·····	(91)
四、染色体工程·····	(95)
五、繁殖生物学技术·····	(100)
第四节 细胞工程的应用现状与展望·····	(104)
一、细胞工程在农、牧、渔业上的应用·····	(104)
二、细胞工程在医学生物学中的应用·····	(108)
三、细胞工程在基础理论研究方面的应用·····	(110)
第三章 酶工程	
第一节 概述·····	(111)
第二节 酶学基础知识·····	(112)
一、酶的结构与功能·····	(113)
二、酶的专一性·····	(114)
三、酶反应的动力学·····	(116)
四、酶活力的测定·····	(119)
第三节 酶工程的技术领域·····	(120)
一、酶制剂工业技术·····	(120)
二、酶和细胞的固定化技术·····	(125)
三、酶分子改造、修饰技术·····	(131)
四、酶抑制剂技术·····	(133)
五、酶的模拟技术·····	(135)
第四节 酶工程的应用现状及展望·····	(135)
一、酶工程与工业·····	(135)

二、酶工程与医药临床	(136)
三、酶工程与食品工业	(136)
第四章 发酵工程	
第一节 概述	(138)
一、发酵工程的定义	(138)
二、发酵工程简史	(139)
第二节 微生物学基础知识	(140)
一、微生物的营养和生长	(141)
二、微生物的代谢	(146)
第三节 发酵工程的技术路线	(150)
一、上游技术	(150)
二、中游技术	(154)
三、下游技术	(157)
第四节 发酵工程应用现状及展望	(161)
一、食品、饮料与发酵工程	(161)
二、医学与发酵工程	(161)
三、能源与发酵工程	(162)
四、环境、农业与发酵工程	(163)
五、材料与发酵工程	(163)
六、化工与发酵工程	(164)

第二编 细胞生物学近代技术概论

第一章 光学显微镜技术

第一节 普通光学显微镜	(165)
第二节 相差显微镜	(170)
第三节 暗视野显微镜	(174)
第四节 荧光显微镜	(176)
第五节 紫外光显微镜	(177)

第六节 偏光显微镜	(178)
第七节 干涉显微镜	(179)
第八节 倒置显微镜	(179)
第二章 电子显微镜技术	
第一节 电镜设计原理及分类	(180)
一、电镜设计原理	(180)
二、电镜分类	(184)
第二节 透射式电子显微镜	(186)
一、透射电镜的基本结构	(186)
二、透射电镜的基本操作	(189)
三、透射电镜的应用	(192)
第三节 扫描式电子显微镜	(193)
一、扫描电镜的基本结构	(193)
二、扫描电镜的应用	(195)
第四节 电镜样品的制备技术	(197)
一、超薄切片技术	(197)
二、负染色技术	(208)
三、核酸大分子的制样技术	(209)
四、电镜放射自显影技术	(210)
五、电镜细胞化学技术	(210)
六、冰冻蚀刻技术	(211)
七、临界点干燥法	(213)
第三章 紫外与可见光分光光度术	(215)
第四章 荧光分光光度术	(222)
第五章 显微分光光度术	(227)
第六章 液相色谱分析技术	(232)
第七章 气相色谱分析技术	(237)
第八章 氨基酸分析技术	(246)

第九章 超速离心技术·····	(252)
第十章 电泳技术·····	(265)
第十一章 免疫细胞化学技术·····	(282)
第十二章 DNA 顺序测定技术 ·····	(287)
第十三章 细胞动力学技术·····	(296)
第十四章 核酸分子杂交技术·····	(307)

第三编 细胞生物学教学实验

第一章 形态观察技术

实验 1.1 透射式电镜的使用及超薄切片的制备 ·····	(314)
实验 1.2 特殊显微镜使用及显微摄影 ·····	(315)
实验 1.3 细胞形态观察及大小测量 ·····	(320)
实验 1.4 细胞核质比的体视学测定 ·····	(323)
实验 1.5 细胞器的分离和观察 ·····	(327)
实验 1.6 细胞骨架的光学显微镜观察 ·····	(330)

第二章 生化测定技术

实验 2.1 鉴定 RNA 的细胞化学方法 ·····	(334)
实验 2.2 鉴定 DNA 的细胞化学方法 ·····	(336)
实验 2.3 PAS 法显示多糖·····	(338)
实验 2.4 碱性磷酸酶显示法(AKP) ·····	(339)
实验 2.5 酸性磷酸酶显示法(ACP) ·····	(341)
实验 2.6 叶绿体及其蛋白质的分离 ·····	(342)
实验 2.7 体外培养细胞的活体观察 ·····	(345)

第三章 染色体分析技术

实验 3.1 染色体标本的制备 ·····	(348)
实验 3.2 人类染色体组型分析 ·····	(352)
实验 3.3 染色体分带技术 ·····	(355)
实验 3.4 染色体核仁组织区的银染法 ·····	(358)

实验 3.5	姊妹染色单体区分染色法	(359)
实验 3.6	早熟染色体凝集诱导	(362)
第四章 细胞培养技术		
实验 4.1	动物细胞培养技术	(365)
实验 4.2	细胞融合	(367)
实验 4.3	植物原生质体的制备与培养	(369)
实验 4.4	显微操作与核移植	(372)
实验 4.5	鱼类血细胞微核诱导	(373)
第五章 同位素应用技术		
实验 5.1	显微放射自显影	(376)
实验 5.2	细胞染色体 DNA 原位杂交	(377)
实验 5.3	Northern 杂交的液闪定量测定	(381)
第六章 生理检测技术		
实验 6.1	细胞电泳	(387)
实验 6.2	细胞膜的渗透性	(388)
附录 1 常用溶液浓度的表示及简便配法		
附录 2 溶液浓度的稀释		(391)
附录 3 氨基酸的代号和密码子		(393)
后记		(395)
		(396)

第一编 生物工程概论

世界科技革命由新技术发展到今天的高技术,在人们公认的高技术领域,信息技术是主导和核心,新材料技术是技术进步的突破口,生物技术是 21 世纪技术革命的主角。其发展顺序是:以信息技术为先导,以新材料技术为基础,以新能源技术为支柱,沿宏尺度领域向海洋和空间技术发展,沿微尺度领域向生物技术开拓。信息、新材料、新能源三项技术是开发组成客观世界的无生命的三要素,海洋和空间技术是开辟人类活动的疆域,只有生物技术是探索极其复杂的包括人类自身在内的生命现象,故不难理解,开发生物技术是最为激动人心的人类向有生命的自然界的宏伟进军。

生物技术(Biotechnology),是生物学与工程技术结合的产物,故亦译为生物工程或生物工艺学。是 70 年代初在分子生物学和细胞生物学基础上发展起来的一个新兴技术领域。是指通过技术手段,利用生物体或生物过程,来生产有经济价值产品的学科。一般认为,生物工程的技术体系主要包括:基因工程(遗传工程)、细胞工程、酶工程和发酵工程(微生物工程)。每一技术体系虽有各自的内容和发展领域,但它们又是相互依赖,互有联系的。普遍认为基因工程是关键,细胞工程是基础,酶工程和发酵工程有赖于基因工程和细胞工程的发展。总的说来,通过诸类工程,人们有可能解决当今世界人类面临的人口飞长、食物短缺、能源危机、环境污染、以及威胁亿万人健康和生命的疑难病症(癌症、艾滋病等)等重大问题,极大地造福人类。

本编以浅显通俗的文字,简单明了的图表,概述生物工程的全貌。重点介绍各技术体系的路线、应用现状和发展前景。

第一章 基因工程

第一节 概述

自本世纪七十年代初,基因工程学诞生,在短短二十几年里已经取得了许多激动人心的成果。基因工程的最大特点就是以重组DNA技术开辟了在短时间内改造生物遗传性的新天地。它填补了生物种属间不可逾越的鸿沟,克服了常规育种的盲目性,使人类有可能按照需要定向培养生物新品种、新类型乃至创造自然界从未有过的新生物。基因工程正以新的势头迅速发展,成为当今生物科学研究领域中最有生命力、最引人注目的前沿学科之一。

一、基因工程的诞生

基因工程发展的道路并不是一帆风顺。现在人们公认,基因工程诞生于1973年,它是数十年来无数科学家辛勤劳动的结果,智慧的结晶。从40年代开始,科学家们从理论和技术两方面为基因工程的产生奠定了坚实的基础。

(一)理论基础

1. 40年代发现了生物的遗传物质是DNA。Avery 1934年在美国的一次学术会上首次报道了肺炎球菌的转化。但这一超越时代的科学成就十年后才被公开发表。事实上,Avery不仅证明DNA是生物的遗传物质,打破了当时人们认为只有蛋白质这样复杂的大分子才能决定细胞的特性和遗传的信条,而且也证明了DNA可以把一个细菌的性状转给另一个细菌,理论意义十分重大。正如诺贝尔奖获得者 Lederberg 指出的,Avery的工作是现代

生物科学的革命开端,也可以说是基因工程的先导。

2. 50年代搞清了DNA的双螺旋结构和半保留复制机理。1953年,Watson和Crick提出了DNA结构的双螺旋模型。这个模型指的是作为主要的遗传物质的生物大分子DNA的结构及其自我复制的模式,同时也说明了基因与蛋白质生物合成的关系,这便是中心法则:DNA→mRNA→蛋白质。对生命科学的发展,它们足以和达尔文学说、孟德尔定律相提并论。

3. 60年代确定了遗传信息的传递方式。Watson和Crick的伟大理论,其重要意义无论如何高度评价也不过分,然而它仅仅揭开了生命现象的一部分本质,而揭开生命现象的另一部分本质的是1961年Monod和Jacob提出的操纵子学说。由于操纵子学说的出现,人们在认识生命基本现象的实质方面才有了基因的调节与控制的观念,有了基因调控的思想。

DNA模板学说和操纵子学说,两者相辅相成地从分子水平上揭开了遗传密码的复制、转录、翻译、突变、调节与控制的奥妙,使人们对于生命基本现象实质的认识大大地具体和深入了一步,这些理论也成为基因工程研究的理论基础,堪称划时代的成就。

(二)技术准备

显然,仅停留在上述这些理论人们还无法自如地得到基因,更无法随心所欲地操作和改造基因。只有在DNA限制性内切酶、载体质粒、连接酶及其它修饰酶的发现之后,人类才有可能实现这一理想。DNA和蛋白质顺序测定方法,基因体外快速突变、DNA人工合成等方法的出现,则加快了基因工程在研究技术方面的发展和成熟。

1. 基因工程的工具酶

1970年,Smith和Wilcox在流感嗜血杆菌中分离并纯化了限制性核酸内切酶Hind I,使DNA分子的切割成为可能。1972年Boyer实验室又发现了名叫EcoRI的核酸内切酶,这种酶每遇到

GAATTC 序列,就会将双链 DNA 分子切开形成 DNA 片段。以后,又相继发现了大量类似于 EcoRI 这样的限制性核酸内切酶,这就使研究者可以获得所需的 DNA 片段,为基因工程提供了技术基础。对基因工程技术突破的另一发现是 DNA 连接酶。1967 年,世界上有五个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶,这种酶能够参与 DNA 裂口的修复。1970 年,美国的 Khorana 实验室发现了一种叫 T₄ DNA 连接酶,具有更高的连接活性。

1970 年,Baltimore 等人 and Temin 等人同时各自发现了逆转录酶,打破了中心法则,使真核基因的制备成为可能。

2. 基因工程的载体

科学家有了对 DNA 切割与连接的工具(酶),还不能完成 DNA 体外重组工作。因为大多数 DNA 片段不具备自我复制能力。为了能够在寄主细胞内繁殖,必须使 DNA 片段连接到特定的具有自我复制的 DNA 分子上。这种 DNA 分子就是基因工程载体(Vector)。基因工程的载体研究先于限制性核酸内切酶。从 1946 年起,Lederberg 开始研究细菌的性因子——F 因子,经过 50、60 年代,相继发现其它质粒,如抗药性因子(R 因子)、大肠杆菌素因子(CoE)。到 1973 年,Cohen 将质粒作为基因工程的载体使用。

总之,分子遗传学的重大突破为基因工程高技术的产生提供了理论基础,而限制性内切酶的发现、质粒作为载体的应用,使 DNA 体外重组新技术的建立成为可能。基因工程诞生的条件已经成熟。

1972 年,美国斯坦福大学的 P·Berg 领导的研究小组,在世界上第一次成功地实现了 DNA 体外重组。他们使用限制性内切酶 EcoRI,在体外对猿猴病毒 SV₄₀ 的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA 分别进行酶切,然后再用 T₄ DNA 连接酶把两种酶切的 DNA 片段连接起来,结果获得了包含 SV₄₀ 和人 DNA 重组的杂种 DNA 分子。1973 年,斯坦福大学的 S·Cohen 等人,也成功地进行了另一个体

外重组实验并实现了细菌间性状的转移。他们将大肠杆菌(*E. coli*)的抗四环素(TC^r)质粒 PSC₁₀₁和抗新霉素(Ne^r)及抗磺胺(S^r)的质粒 R6—3,在体外用限制性内切酶 EcoRI 切割,连接成新的重组质粒,然后转化到大肠杆菌中。结果在含四环素和新霉素的平板中,选出了抗四环素和抗新霉素的重组菌落,即表型为 T^rNe^r的菌落。这是基因工程发展史上第一次实现重组体转化成功的例子。基因工程从此诞生,这一年被定为基因工程诞生的元年。1977年,Itakure 等人用人工合成的生长激素释放抑制素(Somato-statins, SMT)基因,第一次实现了真核基因在原核细胞中的表达,轰动了全世界,基因工程以其旺盛的生命力向前发展。

二、基因工程的定义

基因工程产生以来,还没有一个统一的公认定义。一般认为,基因工程是指:把体外核酸分子(无论采取什么方法从细胞中取得)组合到任何病毒、细菌质粒或其它载体系统(分子),形成遗传物质的新组合,并使之进入到原来没有这类分子的宿主体内,而能持续稳定地繁殖。或者说,它是对 DNA 大分子上的遗传单元(基因)进行体外操作,把不同来源的基因按照设计的蓝图,重新构成新的基因组(即重组体),再把它引入细胞中,构成具有新的遗传特性的生物。

从实质上讲,基因工程的定义强调了外源 DNA 分子的新组合被引入到一种新的寄主生物中进行繁殖。这种 DNA 分子的新组合是按照工程学的方法进行设计和操作的。这就赋予基因工程跨越天然物种屏障的能力,克服了固有的生物种间的限制,扩大和带来了定向创造新生物的可能性,这是基因工程的最大特点。

基因工程问世以来,各种名称相继问世。在文献中常见的有遗传工程(Genetic engineering)、基因工程(Gene engineering)、基因操作(Gene manipulation)、重组 DNA 技术(Recombinant DNA technique)、分子克隆(Molecular cloning)、基因克隆(Gene

cloning)等。这些术语所代表的具体内容彼此具有相关性,在许多场合下被混同使用,难以严格区分。不过它们之间还是有一定区别的。例如,遗传工程比基因工程有更广泛的内容,凡是人工改造生物遗传性的技术如物理化学诱变、细胞融合、花粉培育、常规育种、有性杂交等,都属于遗传工程的内容,还包括基因工程在内。因此,遗传工程包括基因工程,遗传工程不等于基因工程。又如重组 DNA 技术,它是基因工程的核心内容,但严格地说,基因工程除上述的定义所阐明的内容外,还应包括体外 DNA 裂变,体内基因操作以及基因的化学合成等。总之,凡是在基因水平上操作而改变生物遗传特性的技术都属于基因工程。

克隆(Clone)一词有必要加以解释。当它作为名词使用时,是指一个祖先通过无性繁殖方式产生的后代,或具有相同遗传性状的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体;当克隆作动词使用时,是指从同一祖生产这类同一的 DNA 分子群或细胞群的过程。因为体外重组 DNA 的过程中,是通过能够独立自主复制的载体或噬菌体为媒介,把外源 DNA(片段)引入宿主细胞进行繁殖,实质上是从一个 DNA 片段增殖了结构和功能完全相同 DNA 分子群的过程,也为遗传同一的生物品系(它们都带有重组 DNA 分子)成批地繁殖和生长提供了有效的途径。因此,基因工程也可称为基因克隆或 DNA 分子克隆。

第二节 基因的结构与功能

一、基因的基本概念

人们对基因的认识是不断深入的,因此关于基因的概念也是不断发展的。最初的概念是:基因是决定遗传性状的一个基本遗传单位,它和孟德系的遗传因子是同义词。人们只能从它所起的作用或它所产生的遗传效果感知它的存在,当时并没有证实它是物质,