


国家级实验教学示范中心

基础医学实验教学系列教材

# 医学细胞分子生物学实验

苑辉卿 主编

 科学出版社  
www.sciencep.com

国家级实验教学示范中心  
基础医学实验教学系列教材

# 医学细胞分子生物学实验

主 编 苑辉卿

副主编 辛 华 胡晓燕 刘奇迹

编 者 (按姓氏笔画排序)

丁 岩	于春晓	于清水	王小玲	孔 峰
田克立	朱 敬	任桂杰	刘志芳	刘奇迹
李 霞	吴伟芳	辛 华	张孟业	张洁晶
张虞毅	陈丙玺	陈蔚文	邵红莲	苑辉卿
赵 玲	郝建荣	胡晓燕	高贵敏	郭辰虹
郭 强				

科 学 出 版 社

北 京

## 内 容 简 介

实验教学是医学教育的重要内容,是培养学生实践能力和创新精神的创新型人才的重要环节。在实验教学的改革中,我们把医学细胞生物学、医学生物化学与分子生物学、医学遗传学三个学科的实验教学融合成了一个医学细胞分子生物学实验平台,编写了这本涵盖三个学科的实验教材。本教材包括三篇,第一篇为基本实验,分为3章,第一章是医学细胞生物学实验,第二章是医学生物化学与分子生物实验,第三章是医学遗传学实验,分别从细胞形态、细胞内生物化学、分子生物学、遗传学的基本技能角度,培养学生基本的实验操作能力。第二篇为融合实验,每个实验都融合了三个学科的相关内容,通过对同一问题从不同的方面进行综合分析、验证,培养学生的综合分析、解决问题的能力。第三篇是创新实验,通过启发式的问题,使学生能够开阔思路、提出问题、提出解决方案,培养学生的独立思考和创新能力。不同学校可结合自己的特点全部或选择部分实验用于实验教学。本实验教材概念准确、文字简明,层次清晰、使用方便,将三个学科的基本知识点融合在一本教材中,既减轻学生的经济负担,又便于学生和教师了解相关学科的实验内容及学科交叉点,有利于提高教学效果,提高综合素质。

本书适合医学院校5年制、长学制学生使用,也可供研究生参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

医学细胞分子生物学实验 / 苑辉卿主编. —北京:科学出版社,2007

(国家级实验教学示范中心·基础医学实验教学系列教材)

ISBN 978-7-03-019603-3

I. 医… II. 苑… III. 人体细胞学:分子生物学-实验-医学院校-教材  
IV. R329.2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第123882号

责任编辑:胡治国 / 责任校对:钟 洋

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2007年8月第一版 开本:787×1092 1/16

2007年8月第一次印刷 印张:14

印数:1—3 000 字数:322 000

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换<长虹>)

# 前 言

多年来的教学实践使我们体会到,实验教学是培养创新型人才的重要环节;实验教学完全依附于理论教学的传统模式不利于创新人才的培养;改革这种传统模式,构建实验教学既与理论教学密切结合,又不依附于理论教学,重在培养学生实践能力和创新精神的新模式势在必行。我们按照山东大学教学改革统一部署,将基础医学中学科内容相关、实验手段相近的三级学科的实验教学融合为一个实验平台,共构建了5个实验平台,即由人体解剖学、组织学与胚胎学和病理学融合而成的医学形态学实验平台;由生理学、药理学、病理生理学、医学心理学和神经生物学融合而成的医学机能学实验平台;由医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学融合而成的医学免疫学与病原生物学实验平台;由医学细胞生物学、医学生物化学与分子生物学、医学遗传学融合而成的医学细胞分子生物学实验平台;由诊断学、手术学、实验核医学及临床技能培训中心融合而成的临床技能实验平台。每个实验教学平台都是一个独立的教学单位,独立开设实验课程,独立考核、考试、记学分。

多少年来,实验教学的功能只是验证理论和加深对理论的理解,实验教学的内容也千篇一律、多年一贯。随着实验教学模式的改革,我们对实验教学的内容也进行了深层次的更新,新添了融合性和创新性实验,强化了实验教学的实践和创新功能。每个实验平台都包含3个层面的实验,即基本实验、融合实验和创新实验。基本实验与相应学科的理论课同步进行,开设一些经典的验证实验,以巩固理论知识和培养学生的实践动手能力;融合实验是融合了相关学科的知识而设计的一些实验,以培养学生综合运用所学知识、分析和解决问题的能力;创新实验是由教师提出问题并在教师引导下由学生自行设计和完成的一些实验,以培养学生的创新能力。融合实验和创新实验在几个相关学科的理论教学全部完成后进行。在医学院的统一领导下,我们组织了各相关学科的学术带头人和骨干教师,编写了与5个实验教学平台相对应的5本实验教材,每本教材都分为3篇,即基本实验篇、融合实验篇和创新实验篇。

这套实验教学系列教材涵盖了基础医学各学科的全部实验内容,版面字数近百万,内容丰富,文字简明,图表清晰,适用面广。但由于实验教学改革还处于探索阶段,编写这样的改革教材尚无经验可循,加之我们的水平所限,教材中不足之处在所难免,恳请同行专家和同学们批评指正。

高英茂

2007年5月于济南

# 目 录

## 第一篇 基本实验

第一章 医学细胞生物学基本实验 .....	1	实验五 血清 $\gamma$ 球蛋白的分离纯化与鉴定 .....	63
第一节 细胞的形态结构 .....	1	实验六 葡聚糖凝胶分离蓝葡聚糖和溴酚蓝 .....	65
实验一 细胞的一般形态结构观察 .....	1	实验七 葡聚糖凝胶分离血红蛋白和 DNP-糜蛋白酶混合液 .....	67
实验二 细胞的显微测量技术 .....	5	实验八 离子交换层析分离混合氨基酸 .....	68
实验三 细胞的超微结构 .....	6	第三节 电泳实验 .....	69
第二节 细胞生理活动 .....	13	实验九 血清蛋白质乙酸纤维素薄膜电泳 .....	69
实验四 胞质环流 .....	13	实验十 血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳 .....	71
实验五 细胞吞噬 .....	14	实验十一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清 LDH 同工酶 .....	72
实验六 细胞活性鉴定 .....	15	实验十二 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量 .....	74
实验七 细胞融合 .....	16	实验十三 等电聚焦法测定蛋白质等电点 .....	77
第三节 细胞化学成分的显示 .....	18	第四节 酶学实验 .....	79
实验八 普通细胞化学 .....	19	实验十四 pH 对酶促反应速度的影响 .....	79
实验九 核酸细胞化学 .....	23	实验十五 温度对酶促反应速度的影响 .....	82
实验十 酶细胞化学 .....	27	实验十六 底物浓度对酶促反应速度的影响 .....	83
实验十一 荧光细胞化学与免疫荧光细胞化学 .....	31	实验十七 抑制剂对酶促反应速度的影响 .....	85
第四节 细胞增殖 .....	36	实验十八 酶的提取及比活性测定 .....	87
实验十二 动物细胞的有丝分裂 .....	36	第五节 物质代谢实验 .....	92
实验十三 植物细胞的有丝分裂 .....	38	实验十九 胰岛素对血糖含量的影响 .....	92
实验十四 X 染色质标本制备与观察 .....	40	实验二十 邻甲苯胺法测血糖含量 .....	93
实验十五 早熟染色体凝集(PCC)的诱导和观察 .....	42	实验二十一 糖酵解中间产物的鉴定 .....	94
第五节 细胞培养 .....	45	实验二十二 血清中谷丙转氨酶(GPT)活性的测定 .....	96
实验十六 原代细胞培养 .....	45	实验二十三 血清脂类薄层层析 .....	98
实验十七 细胞传代培养 .....	48	第六节 核酸实验 .....	99
实验十八 体外培养细胞的观察方法 .....	51	实验二十四 核糖核酸的提取 .....	99
第二章 医学生物化学与分子生物学基本实验 .....	57		
第一节 蛋白定量分析实验 .....	57		
实验一 双缩脲法测定蛋白质含量 .....	57		
实验二 Folin-酚测定蛋白质含量 .....	58		
实验三 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量 .....	60		
实验四 紫外分光光度法测定蛋白质含量 .....	61		
第二节 层析分离纯化实验 .....	63		



实验二十五 核糖核酸的测定 .....	100
实验二十六 脱氧核糖核酸提取 .....	101
实验二十七 脱氧核糖核酸的测定 .....	101
第七节 分子生物学实验 .....	103
实验二十八 真核细胞 DNA 的制备与定量 .....	103
实验二十九 质粒 DNA 的提取与定量 .....	104
实验三十 DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....	106
实验三十一 DNA 的限制性酶切反应 .....	107
实验三十二 目的 DNA 片段的回收 .....	109
实验三十三 大肠杆菌感受态细胞的制备 .....	110

实验三十四 DNA 的连接转化及阳性克隆的筛选 .....	111
<b>第三章 医学遗传学基本实验 .....</b>	<b>113</b>
实验一 人类外周血淋巴细胞培养 .....	113
实验二 人类外周血淋巴细胞染色体的制备 .....	114
实验三 人类染色体 G-显带 .....	116
实验四 正常人类染色体 G 带核型分析 .....	117
实验五 人类遗传性状分析 .....	120
实验六 短串联重复序列 (STR) 的多态性分析 .....	122

## 第二篇 融合实验

实验一 培养细胞的凋亡检测 .....	128
实验二 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增目的基因 .....	137
实验三 产前基因诊断的方法 .....	141
实验四 真核基因在大肠杆菌中的表达 .....	142
实验五 培养细胞绿色荧光蛋白基因转染及荧光显微镜检测 .....	144
实验六 地高辛标记探针的制备及 Southern 杂交分析遗传病 .....	145
实验七 Northern 杂交分析 .....	148
实验八 细胞核的分离提取、DNA 的染色观察 .....	

及定量分析 .....	151
实验九 凋亡细胞的诱导及凋亡带的检测 .....	152
实验十 细胞内 RNA 的定位及电泳分析 .....	154
实验十一 人类淋巴细胞培养及细胞 ATP 活力检测 .....	155
实验十二 p53 基因与肺癌发生关系的分析 .....	156
实验十三 利用遗传多态位点亲权鉴定 .....	157
实验十四 蛋白质印迹 (Western blotting) .....	157
实验十五 四氯化碳致培养肝细胞损伤及 SOD 活性检测 .....	159

## 第三篇 创新实验

实验一 细胞凋亡与细胞坏死实验设计 .....	162
实验二 细胞损伤保护实验设计 .....	162
实验三 糖尿病的生化及遗传检测分析实验 .....	163
实验四 唐氏综合征的产前诊断方法 .....	163
实验五 小鼠组织细胞功能分析 .....	163
实验六 小鼠组织特种细胞的特征性成分的 .....	

鉴定 .....	164
实验七 家族性高胆固醇血症的诊断方法 .....	164
实验八 血友病的诊断 .....	166
实验九 重组人红细胞生成素在细胞中的表达、分离和纯化 .....	167
实验十 绿色荧光蛋白的表达、检测及应用 .....	167

<b>附录 .....</b>	<b>169</b>
附录一 实验室规则 .....	169
附录二 实验室安全及防护 .....	169
附录三 实验室常用玻璃仪器的洗涤与清洁 .....	171
附录四 生物绘图的要求与方法 .....	174
附录五 生物学实验设计报告 .....	175
附录六 常用实验技术原理 .....	175

# 第一篇 基本实验

## 第一章 医学细胞生物学基本实验

细胞是生命体的基本结构单位和功能单位,人和动物细胞的直径一般为 $10\sim 30\mu\text{m}$ ,而人眼的最大分辨率是 $0.1\text{mm}$ ,光学显微镜的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ,电子显微镜的分辨率是 $0.2\text{nm}$ ,因此要观察细胞或其内部结构,需要借助光学显微镜和电子显微镜,通常把在光学显微镜下观察到的细胞的结构称为显微结构,电子显微镜下观察到的结构称为超微结构。

### 第一节 细胞的形态结构

#### 实验一 细胞的一般形态结构观察

##### 【实验目的】

1. 掌握光镜下细胞和细胞器的形态结构。
2. 掌握临时制片的方法。
3. 掌握生物绘图法。

**【实验原理】** 动物有机体的细胞形态多种多样,有圆形、柱形、扁平形、梭形、成纤维形、不规则形等,各种形态与其功能状态相适应,各种类型细胞虽然形状和大小不一,但都具有共同的基本结构特点:都是由细胞表面、细胞核及细胞质里的线粒体、高尔基复合体、中心体、细胞骨架等细胞器组成。本实验用光学显微镜观察不同类型的细胞及几种细胞器的形态结构及分布。

##### 【实验内容与方法】

#### 一、细胞的一般形态结构观察

##### 1. 蝾螈表皮细胞

(1) 标本制备:取约 $5\text{mm}^2$ 的小片新鲜脱落的蝾螈表皮,10% 甲醛溶液固定4小时,蒸馏水漂洗后H.E染色,脱水、透明后树胶封片。

(2) 观察:低倍光学显微镜下找到标本后,换高倍镜调焦至图像清晰,可见细胞具有颜



色较浅的细胞边界,细胞核紫红色、圆形,位于细胞中央,核内可见有1~3个圆形深紫红色核仁,细胞核内除核仁外还有不均一的紫红色染色质。(图1-1-1)

## 2. 蝾螈小肠柱状细胞

(1) 标本制备:蝾螈小肠石蜡横切片,H.E染色。

(2) 观察:低倍光学显微镜下观察可见蝾螈小肠上皮细胞为柱状、排列整齐,高倍镜下可见柱状细胞间有清晰的界限,细胞顶端游离面有纹状缘,核圆形位于细胞基地部,为紫红色。(图1-1-2)

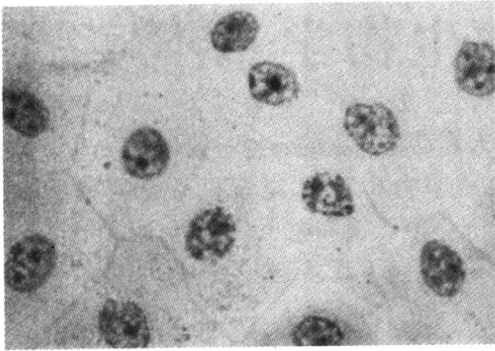


图1-1-1 蝾螈表皮细胞镜下图

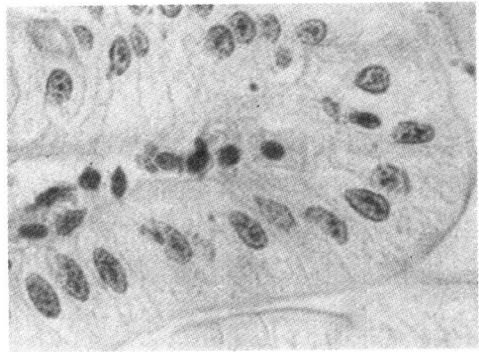


图1-1-2 蝾螈小肠柱状细胞镜下图

## 3. 神经细胞

(1) 标本制备:原代培养新生鼠脊髓神经细胞,H.E染色。

(2) 观察:油镜下可见许多有突起的脊髓神经细胞,胞体染成红色,形态多样,突起长短不一(双极神经细胞多为枣核形,三极神经细胞多为三角形),细胞核大而圆,染成蓝紫色。(图1-1-3)

## 4. 血细胞

(1) 蟾蜍血细胞制备:制备蟾蜍血涂片,甲基绿-派洛宁混合染液染色。

(2) 观察:低倍镜下红细胞为椭圆形,染成红色。细胞核位于中央,圆形或椭圆形,染成蓝绿色。转换高倍镜,可见有的细胞核中有被染成红色的核仁。(图1-1-4)

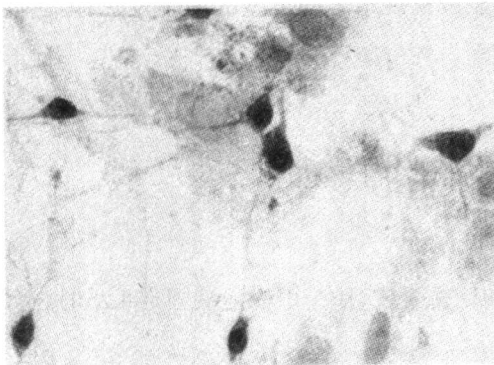


图1-1-3 新生鼠脊髓神经细胞镜下图

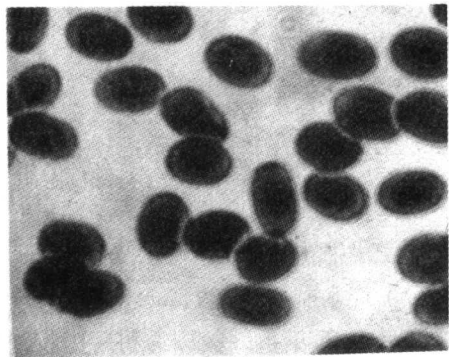


图1-1-4 蟾蜍血涂片镜下图





(3) 人血细胞制备:取耳垂血一滴,制备血涂片,瑞氏(Wright)染色。

(4) 观察:油镜下,红细胞圆形,粉红色,成圆盘状,中央略薄,着色浅,四周略厚,无核,数量多。白细胞核明显,核形态多样,有分叶核、肾形核或圆形核。(图 1-1-5)

### 5. 小鼠精细胞

(1) 标本制备:取雄性小鼠睾丸,剪碎,用 2.2% 枸橼酸钠溶液制成精子悬液,推片,晾干后 Giemsa 染色。

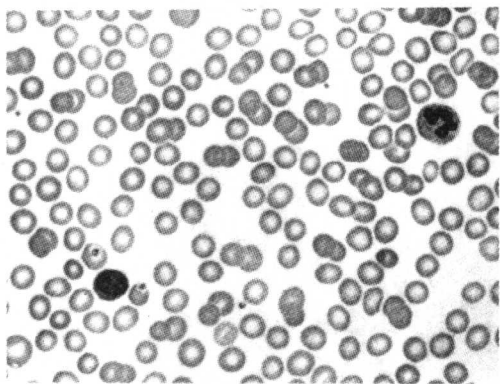


图 1-1-5 人血涂片镜下图

(2) 观察:低倍镜下可见视野中有多个染成紫红色的蝌蚪样的精子,转换高倍镜,可见精子头部呈镰刀状,颜色深染,紫红色。尾部为一条细长的鞭毛。(图 1-1-6)

### 6. 小鼠肝细胞

(1) 标本制备:小鼠肝组织制备石蜡切片,Feulgen 法染色,亮绿复染细胞质。

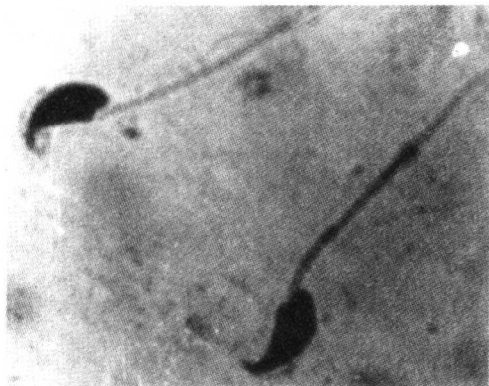


图 1-1-6 小鼠精细胞镜下图

(2) 观察:低倍镜下观察可见围绕中央静脉辐射状排列的肝索。高倍镜下肝细胞为多边形,染成红色,整齐排列成肝索,细胞核呈圆形,紫红色,位于细胞中央。(图 1-1-7)

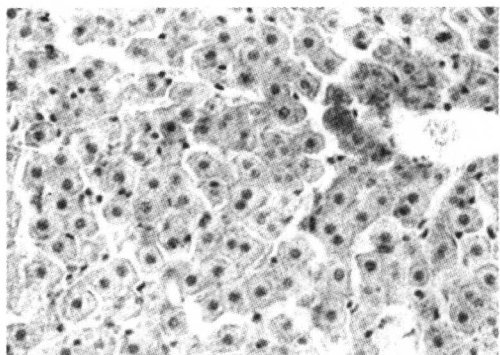


图 1-1-7 小鼠肝细胞镜下图

## 二、细胞器的观察

### 1. 高尔基体

(1) 标本制备:兔神经节石蜡切片,镀银染色。

(2) 观察:低倍镜下,在神经节内可见多个浅黄色圆形或卵圆形的神经节细胞。高倍镜下观察可见细胞中央有圆形不着色区域,即细胞核。有的核内可见有染成浅黄色的核仁。在核周围的细胞质中高尔基体被染成棕褐色,呈斑块状或扭曲的条索状结构。(图 1-1-8)

### 2. 线粒体

(1) 方法一:永久制片。

1) 标本制作:制备蛙肾小管石蜡切片,铁苏木精染色。

2) 观察:肾小管在低倍镜下呈圆形、椭圆形的环形管状结构。管壁是由单层锥形细胞



构成,中央有管腔。换高倍镜和油镜观察,细胞中央不着色的圆形区是细胞核,内有一个或多个染成深蓝色的核仁。细胞的界限不清楚。在细胞质里有很多染成蓝黑色的短杆状,即线粒体。(图 1-1-9)

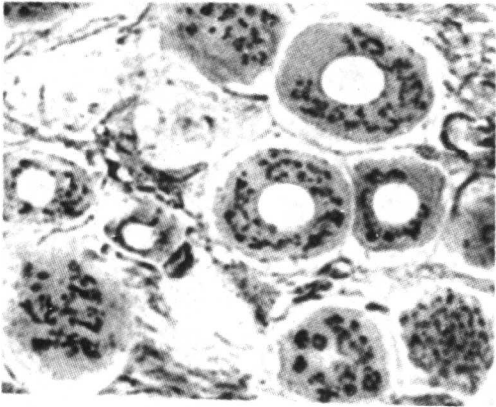


图 1-1-8 兔神经节石蜡切片



图 1-1-9 蛙肾小管石蜡切片

## (2) 方法二:临时制片(线粒体活体染色)

1) 人口腔黏膜上皮细胞临时制片的制备:用绸布擦净载玻片和盖玻片,在载玻片的中央滴一滴詹纳斯绿染液,用牙签在口腔面颊部刮取细胞,均匀涂于染液中,染色 0.5~1 分钟,用镊子夹住盖玻片的一端,以 45° 倾斜,慢慢落下盖在液滴上,再用吸水纸吸取多余的水分,注意不要产生气泡。

2) 观察:低倍镜下可见成片或分散存在的口腔内黏膜上皮细胞呈扁平状,核呈圆形或椭圆形,位于细胞中央,被染成蓝色。转换高倍镜观察,可见细胞质中散在一些被染成亮绿色的粒状和短棒状的颗粒,即线粒体。由于线粒体中的细胞色素氧化酶能使詹纳斯绿保持氧化状态而呈淡蓝绿色,而在线粒体以外的细胞质区域的染料则被还原成无色,故能特异地对线粒体进行活体染色。

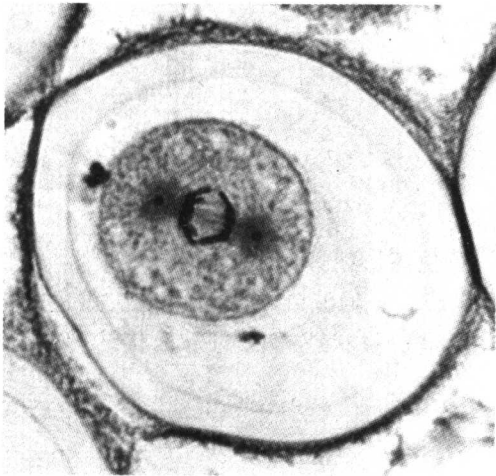


图 1-1-10 马蛔虫子宫石蜡切片

## 3. 中心体

(1) 标本制作:制备马蛔虫子宫石蜡切片,铁苏木精染色。

(2) 观察,低倍镜下观察马蛔虫子宫切片,可见众多椭圆形的受精卵,选择处于分裂中、后期的细胞,转换高倍镜观察,可见处于分裂中、后期的马蛔虫受精卵的两极各有一颗染色很深的小黑点,这就是中心粒所在的位置。中心粒周围呈透亮区的部分为中心球,两者构成中心体,其外周有许多放射状分布的细丝,即星射线,合称为星体。(图 1-1-10)

#### 4. 细胞骨架

(1) 标本制备:将成纤维细胞培养在盖片上,处理后用考马斯亮蓝 R250 染色。

(2) 观察:低倍镜下可见成片染成天蓝色的成纤维细胞,细胞核深染,位于细胞中央。转换高倍镜观察,可见沿细胞长轴方向分布着一些被染成蓝色的丝状纤维,这就使由许多微丝聚集而成的微丝束,有的交织成网状。(图 1-1-11)

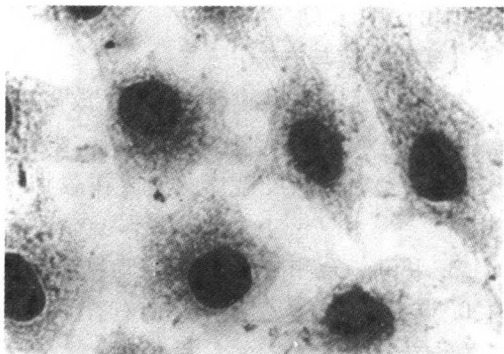


图 1-1-11 成纤维细胞镜下图

#### 【实验准备】

1. 材料 蝾螈表皮装片,蝾螈小肠横切片,兔脊髓神经涂片,蟾蜍血涂片,小鼠精子涂片,小鼠肝细胞切片,洋葱表皮装片,人口腔黏膜上皮涂片。

2. 试剂 0.03% 詹纳斯绿(Janus Green B)染液。

3. 器材 载玻片,盖玻片,吸管,牙签,纱布,擦镜纸,眼科剪,小镊子。

(邵红莲)

## 实验二 细胞的显微测量技术

#### 【实验目的】

1. 熟悉显微测微尺的测量原理及使用注意事项。

2. 学会在光学显微镜下测量细胞的长度。

【实验原理】 在显微镜下用来测量细胞的工具叫显微测量计,由目镜测微尺(ocular micrometer)和镜台测微尺(stage micrometer)组成,在测量细胞时两种测微尺要配合使用。(图 1-1-12)

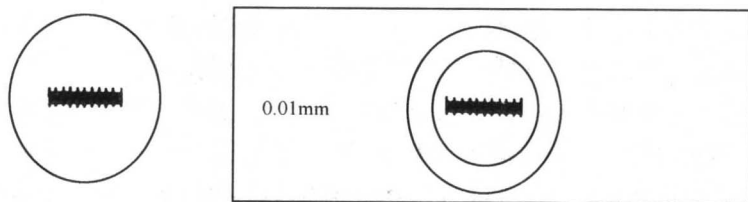


图 1-1-12 目镜测微尺和镜台测微尺外观形态

目镜测微尺是一块圆形玻片,直为 20mm,放在目镜上的焦平面上,其上有 10mm 长的线段,分成 100 小格,每一小格表示的实际长度随不同倍数的物镜和镜筒的长度不同而异。

镜台测微尺是一个特制的载玻片,在它的中央粘有一片圆形有精细刻度的盖片,其刻度标尺全长为 1 或 2 mm,分为 100 或 200 等份的小格,每小格的长度为 0.01mm (10 $\mu$ m),



通过目镜测微尺和镜台测微尺刻度的重合,可计算出在不同倍数物镜下目镜测微尺每小格所表示的长度。在测量细胞时,移去镜台测微尺,换上被测标本,用目镜测微尺即可测得观察标本的实际长度。

#### 【实验内容与方法】

1. 将目镜测微尺的刻度面向下放入目镜镜筒视野光阑上,观察目镜并旋动目镜,使目镜测微尺呈水平状态,“0”端在左侧。

2. 将镜台测微尺盖片向上放在载物台上,用低倍镜观察,调节焦距看清镜测微尺的刻度。

3. 移动镜台测微尺,同时转动目镜,使目镜测微尺与镜台测微尺平行且重叠,并将两尺的“0”点刻度对齐。然后从左向右查看两尺刻度线重合处,记录重合处目镜测微尺和镜台测微尺的刻度。

用以下公式计算目镜测微尺每小格表示的实际长度:

$$\text{目镜测微尺每小格实际长度} = \text{镜台测微尺格数} / \text{目镜测微尺格数} \times 10\mu\text{m}$$

4. 移去镜台测微尺,换以观察标本(切片或培养细胞),用目镜测微尺测量细胞的大小,所得小格数乘以目镜测微尺每小格实际长度,即为被测物的实际长度。

#### 【注意事项】

1. 更换显微镜或使用同一显微镜的高倍镜或油镜测量时,要用同样的方法重新计算高倍镜或油镜下目镜测微尺每小格的实际长度。

2. 在测量时要注意将被测物体放在视野中央,因为这个位置镜像最清晰,相差最小。

3. 每一种被测物体(细胞)需反复测量数个或数十个,采用其平均值。

(邵红莲)

## 实验三 细胞的超微结构

#### 【实验目的】

1. 观察细胞的超微结构照片、幻灯片及录像,掌握细胞的超微结构特点。

2. 将各种细胞器的结构与功能结合起来复习各细胞器的功能。

【实验原理】 光学显微镜,由于受光波特性的限制,分辨力较低,只能观察到 $0.2\mu\text{m}$ 以上的结构,对细胞内许多微细结构无能为力。电子显微镜用波长比可见光短得多的电子束做光源,使分辨力达到 $0.2\sim 0.25\text{nm}$ ,可观察到细胞内各种细胞器的微细结构。通常把电镜下所观察到的细胞结构称为超微结构(ultramicroscopic structure)。

【实验内容与方法】 细胞根据进化的程度分两类:原核细胞(prokaryotic cell)和真核细胞(eukaryotic cell)。

原核细胞没有核膜,遗传物质为裸露的环状DNA分子,由细胞壁、细胞膜、细胞质、核糖体等构成,没有内膜系统,核糖体为70S型,原核细胞构成的生物为原核生物(prokaryote),均为单细胞生物,通常称为细菌(bacterium)。有的细菌还有荚膜、鞭毛、菌毛等特殊结构。绝大多数细菌的直径大小在 $0.5\sim 5\mu\text{m}$ 之间。某些原核细胞质膜内褶形成小管状结构,称



为中膜体(mesosome)或间体,中膜体扩大了细胞膜的表面积,提高了代谢效率,还可能与DNA的复制有关。

真核细胞除了具有质膜、核膜外,发达的细胞内膜形成了许多功能区隔。由膜围成的各种细胞器,如核膜、内质网、高尔基体、溶酶体等。在结构、功能上形成了一个连续的体系,称为内膜系统(endomembrane system)。内膜系统将细胞质区隔化(compartmentalization)。不仅使细胞内表面积增加了数十倍,各种生化反应能够有条不紊地进行,细胞代谢能力也比原核细胞大为提高。下面叙述真核细胞各部分结构的超微结构及相关功能。

1. 质膜(plasma membrane) 细胞与外环境之间的界膜。电镜下高倍放大,质膜呈暗-明-暗三层结构,即内外两层电子致密层,厚度2~2.5nm,有脂双分子层的极性头部组成,中间夹有一层透亮层,厚度为3.5nm,由脂双分子层的非极性尾部组成。这种暗-明-暗三层结构又称为单位膜(unit membrane)。细胞内所有的膜性结构均具有单位膜的形式。

动物细胞表面存在着一层可被钉红染色的较厚(约10~20nm)的致密物质,称为细胞外被(cell coat)。其边界不太明确,细胞外被实质上是质膜结构的一部分,是由构成质膜的糖蛋白和糖脂伸出的寡糖链组成的。对细胞有保护、连接、支持、识别、免疫等功能。

2. 细胞连接(cell junction) 细胞连接是细胞间连接结构,由细胞质膜局部区域特化形成。对维持组织的完整性非常重要。包括紧密连接、黏着带、黏着斑、桥粒、半桥粒、通讯连接等。

(1) 紧密连接(tight junction):存在于脊椎动物的腔道和腺体上皮细胞间,在电镜下可以看到细胞顶部的侧面连接区域具有跨膜蛋白形成的焊接线网络,焊接线处相邻细胞间的质膜紧密相接,没有缝隙。紧密连接封闭了细胞之间的空隙,防止分子沿细胞间隙渗入体内。上皮细胞层对小分子的透性与嵴线的数量有关,有些紧密连接甚至连水分子都不能透过。

(2) 黏着带(adhesion belt):呈带状环绕细胞,位于上皮细胞顶部侧面紧密连接的下方。黏着带处相邻细胞的间隙15~20nm。间隙中的黏合分子为E-钙黏蛋白,它是跨膜蛋白,相邻细胞的E-钙黏蛋白的细胞外部分在间隙处连接,内侧通过几种附着蛋白与微丝束结合在一起,微丝束与质膜平行排列,这样相邻细胞中的肌动蛋白丝束通过钙黏蛋白和附着蛋白连接成了一个网络,同时把相邻细胞联合在一起。

(3) 黏着斑(adhesion plaque):位于细胞与基膜间,通过整合蛋白(integrin)把细胞中的肌动蛋白束和基质连接起来。连接处的质膜呈盘状,所以称为黏合斑。

(4) 桥粒(desmosome):是相邻细胞间形成的纽扣状连接结构,细胞间隙约30nm,相邻细胞的跨膜糖蛋白相互连接,质膜内侧方有细胞质附着蛋白质形成的厚15~20nm的致密斑,斑上有中间纤维相连,中间纤维的性质因细胞类型而异,如:在上皮细胞中为角蛋白纤维,在心肌细胞中则为结蛋白纤维。因此,相邻细胞中的中间纤维通过致密斑和跨膜糖蛋白构成了穿胞细胞骨架网络。桥粒具有强的抗机械拉力作用,存在于承受强拉力的组织中,如皮肤、口腔、食管等处的复层鳞状上皮细胞之间和心肌中。

(5) 半桥粒(hemidesmosome):在结构上类似桥粒,位于上皮细胞基面与基膜之间,它桥粒的不同之处在于:①细胞与基膜形成的连接方式;②跨膜连接蛋白为整联蛋白而不是钙黏素,整联蛋白是细胞外基质的受体蛋白;③细胞内的附着蛋白为角蛋白。



(6) 缝隙连接(gap junction):在连接处相邻细胞间有2~4nm的缝隙,连接区域最大直径可达0.3 $\mu$ m。缝隙连接的基本单位是连接子(connexon),即由相邻细胞质膜上6个跨膜蛋白亚单位环绕成直径8nm,中央有约1.5nm的孔道的蛋白多聚体。缝隙连接的通道可以允许分子质量小于1.5kD的分子通过,起着细胞通讯和协调细胞代谢和功能的作用。缝隙连接的通透性是可调节的。

3. 核糖体(ribosome) 主要化学成分是RNA和蛋白质。电镜下,是无包膜的电子致密颗粒,略呈圆形或椭圆形,平均直径在15~25nm。核糖体由大、小两个亚单位组成。大亚基略呈半圆形,直径约23nm,有一侧伸出三个突起,中心有一条中央管,沉降系数为60S。其上有与氨酰-tRNA结合的位点,还含有转肽酶活性部位。小亚基呈长条形,大小为23nm $\times$ 12nm,沉降系数为40S,其上有蛋白质合成启动因子结合位点、起始氨酰-tRNA结合部位和mRNA结合位点。电镜下,核糖体常成群呈环状或螺旋状存在,与mRNA结合,构成多聚核糖体(polyribosome)。附着于内质网上的称附着核糖体(bound ribosome),主要合成外输性蛋白质。散在于胞质中的称游离核糖体(free ribosome),合成细胞本身生长所需的蛋白质。

4. 内质网(endoplasmic reticulum) 是广泛分布于细胞质内的膜性管状或囊状结构,它的膜比质膜薄,约6nm厚度,膜围成的空间称为ER腔。根据其膜外表面有无核糖体附着,分为粗面内质网和滑面内质网两种类型。

(1) 粗面内质网(rough endoplasmic reticulum):由厚约6nm的膜所构成相连的长形小管或扁平囊泡。膜的外表面附有核糖体。多成层排列呈同心圆状,主要合成各种酶原、黏蛋白、抗体、肽类激素等外输性蛋白质,并对新合成的蛋白质起着储存、运输、分隔的作用。

(2) 滑面内质网(smooth endoplasmic reticulum):多为相互连通、迂回的膜性管道结构。电镜切片上常呈小泡状或短管状,长管状结构较少见。膜的厚度小于6nm,表面无核糖体附着。大多数细胞的滑面内质网,虽然形态十分相似,但化学组成、结合的酶系统、大分子结构都有差异,因而功能也不同。其主要功能与脂类的合成、糖原分解和解毒功能有关。

5. 高尔基复合体(Golgi complex) 电镜下观察到高尔基复合体是由扁平囊(sacculle)、大泡(vacuole)、小泡(vesicle)组成。扁平囊由单层膜构成,膜厚6~7nm,中间形成囊腔,周缘多呈泡状,4~8个扁平囊在一起,构成高尔基体的主体,扁平囊之间距为20~30nm,囊腔宽约6~9nm。高尔基体顺面的网络结构(cis Golgi network, CGN),是高尔基体的入口区域,接受由内质网合成的物质并分类后转入中间膜囊。高尔基体中间膜囊(medial Golgi),多数糖基修饰,糖脂的形成以及与高尔基体有关的糖合成均发生此处。高尔基体反面的网络结构(trans Golgi network, TGN),由反面一侧的囊泡和网管组成,是高尔基体的出口区域,功能是参与蛋白质的分类与包装,最后输出。

高尔基体各部分膜囊具有不同的细胞化学反应:①嗜银反应,经银酸浸染后,高尔基体的cis面膜囊被特异地染色;②焦磷酸硫酸酶(TPP酶)的细胞化学反应,可特异地显示高尔基体的trans面的1~2层膜囊;③烟酰胺腺嘌呤二核苷酸酶(NADP酶)的细胞化学反应,是高尔基体中间几层扁平囊的标志反应;④胞嘧啶单核苷酸酶(CMP酶)的细胞化学反应,常常可显示靠近trans面上的一些膜囊状和管状结构,CMP酶也是溶酶体的标志酶,溶酶体就是在此处分泌产生的。



高尔基体的主要功能将内质网合成的蛋白质进行加工、分类与包装,然后分门别类地送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。

6. 溶酶体(lysosome) 是由单位膜包围而成的囊状细胞器,直径从25nm~0.8 $\mu$ m不等。溶酶体膜的主要特点是:①膜有质子泵,将 $H^+$ 泵入溶酶体,使其pH降低。②膜蛋白高度糖基化,以防自身膜蛋白被降解。溶酶体内含多种水解酶,其中酸性磷酸酶为溶酶体的标志酶。初级溶酶体所含酶尚未与底物作用,它呈圆形或卵圆形,直径25~50nm,含有电子染色均匀而致密的细颗粒状内容物,较集中地分布在高尔基体的分泌面附近。当初级溶酶体与异噬泡(heterophagosome)、自噬泡(autophagosome)以及细胞内多余分泌颗粒融合,便形成了各种次级溶酶体,呈现出多形态的结构。不能再消化物质的次级溶酶体称为残余小体(residual body),内容物多样,例如有脂褐素、髓样体、脂滴等,但不含水解酶,这些残余物在电镜下呈现较高电子密度。

溶酶体的主要作用是消化作用。

7. 过氧化物酶体( Peroxisome) 过氧化物酶体也称微体,是由单位膜包裹的囊状细胞器,膜厚约6nm,直径0.3~0.5 $\mu$ m,常呈圆形或卵圆形。有的中央常含有电子密度较高、呈规则的结晶状结构,称类核体(nucleoid)。微体的形态和数量随动物种类、细胞种类不同而有较大差异。它的特征酶是过氧化氢酶,能分解多余的过氧化氢,调节和控制过氧化氢的含量,具有解毒作用。

8. 线粒体(mitochondria) 大多呈圆形,卵圆形和杆状,长度差别较大,从2~5 $\mu$ m不等,直径平均为500nm。电镜下,线粒体是由双层单位膜包围而成的封闭囊状细胞器。外膜平坦,厚约6nm,表面光滑,有直径1~3nm的小孔。内外膜之间的间隙称为外室或膜间腔,宽约6~8nm,电子密度低。

内膜结构复杂,厚约5~7nm,内膜向内折叠形成许多嵴(cristae),嵴有板状、管状两种基本形态。内膜和嵴上附有许多基粒,每个基粒由头部、柄部和基片三部分构成,用负染法在电镜下清晰看见,线粒体的氧化磷酸化结构和电子传递链位于内膜,因此从能量转换角度来说,内膜起主要的作用。内膜的标志酶为细胞色素c氧化酶。内膜所包围的腔隙称为内腔,充满细颗粒状基质,电子密度较大。基质含有多种酶系、基质颗粒、DNA、RNA、核糖体等。

线粒体是细胞内生物氧化的主要场所,三羧酸循环、电子传递、氧化磷酸化等生化过程都在此进行,细胞生命活动95%的能量来自线粒体。

9. 细胞骨架(cytoskeleton) 是指真核细胞中的蛋白纤维网络结构,由微管(microtubule)、微丝(microfilament)和中间纤维(intemediate filament)构成。

(1) 微管(microtubule):电镜下微管是中空柱状、有极性的细胞器,外径25nm,内腔直径15nm,管壁厚度平均为5nm,长度变化不定,约几个 $\mu$ m。微管的主要成分是微管蛋白, $\alpha$ 、 $\beta$ 微管蛋白以异二聚体的形式组成原丝,13根细丝围成微管。组成微管的还有微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs),此类分子结合微管的结构域和向外突出的结构域。突出部位伸到微管外与其他细胞组分(如微管束、中间纤维、质膜)结合。MAPs的主要功能是:①促进微管聚集成束;②增加微管稳定性或强度;③促进微管组装。

单管微管,存在于胞质,它的结构不太稳定,易受低温、 $Ca^{2+}$ 和秋水仙素的影响而解聚,



一旦这些外界因素消除,微管又可重组。胞质内有大量单管微管,参与细胞运动、维持细胞形态等功能。还可形成二联微管、三联微管,如中心粒、纤毛、鞭毛内的微管,与细胞器的位移、细胞运动有关。

(2) 微丝(microfilament):为直径约6nm的实心纤维,由球形肌动蛋白单体G-actin组成,微丝是由两条线性排列的肌动蛋白链形成的螺旋,状如双线捻成的绳子,具有极性,微丝常成束平行排列在细胞膜下。

微丝结合蛋白有很多种,它们从不同角度调控微丝的组装,包括调节肌动蛋白单体形成肌动蛋白多聚体、肌动蛋白多聚体组装成微丝,影响微丝的稳定性和长度和构型。在细胞中起控制微丝的形成、交联、盖帽和截断的作用并可移动细胞中的微丝等。

(3) 中间纤维(intermediate filament):直径约为10nm的纤维,是一类形态上非常相似,而化学组成上有明显差异的蛋白质纤维,可根据组织来源分为角质纤维蛋白、神经纤维蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白、波形蛋白五种,细胞核中的核纤层蛋白(lamin)也是一种中间纤维。中间纤维具有组织特异性,不同类型细胞含有不同的蛋白质。肿瘤细胞转移后仍保留源细胞的中间纤维类型,因此可用相应的中间纤维抗体来鉴定肿瘤的来源。

中间纤维蛋白分子由一个310个氨基酸残基形成的 $\alpha$ 螺旋杆状区,以及两端非螺旋化的球形头(N端)尾(C端)部构成。杆状区是高度保守的,头部和尾部的氨基序列在不同类型的中间纤维中变化较大,根据X衍射,电镜观察和体外装配的实验结果推测,中间纤维的装配如下:①两个单体,形成两股超螺旋二聚体;②两个二聚体反向平行组装成四聚体,三个四聚体长向连成原丝;③两个原丝组成原纤维;④8根原纤维组成中间纤维,横切面具有32个单体。由于IF是由反向平行的 $\alpha$ 螺旋组成的,所以中间纤维与微丝微管不同,它没有极性。

中间纤维的组成还有中间纤维结合蛋白(intermediate filament associated protein, IFAP),其功能是使中间纤维交联成束、成网,并把中间纤维交联到质膜或其他骨架成分上。

#### 10. 由微管组成的细胞器

(1) 纤毛(cilium)和鞭毛(flagellum):都是由微管组成,且结构相同,纤毛、鞭毛的主体结构为“9+2”微管结构,即9组二联管和2个中央微管构成。纤毛(如草履虫)多而短,而鞭毛(如精子和眼虫)少而长;有的细胞,如气管和输卵管上皮,虽有纤毛,但细胞本体不动,纤毛的摆动可推动物质越过细胞表面,进行物质运送。纤毛和鞭毛与细胞的运动有关。

(2) 中心粒(centriole):中心粒是短筒状的细胞器,长150~400nm,直径150nm,筒壁由9组纵行的三联微管有规律地围成风轮状的结构,每组三联微管都包埋在电子密度较高的均质状物质之中。两个中心粒垂直排列与中心粒周围物质一起组成中心体。中心粒是微管组织中心,有丝分裂时的纺锤丝微管在此形成,参与染色体的移动。

#### 11. 由微丝组成的相关细胞结构

微绒毛(microvilli):是动物细胞表面伸出的细长指状突起。微绒毛直径约为0.1 $\mu$ m。长度因细胞种类和生理状况不同而有所不同。小肠上皮细胞刷状缘中的微绒毛,长度约为0.6~0.8 $\mu$ m。微绒毛的轴芯由肌动蛋白丝束组成,肌动蛋白丝之间由许多绒毛蛋白(villin)和毛缘蛋白(fimbrin)组成的横桥相连,使微丝束形成紧密的一束。肌球蛋白1(myosin-I)和钙调蛋白





在微丝束侧面与细胞膜内面形成横桥,这些横桥通过张力使微丝束处于微绒毛的中心位置。

微绒毛扩大了细胞的表面积,有利于细胞同外环境的物质运输。小肠微绒毛使细胞的表面积扩大了30倍,大大有利于大量吸收营养物质。肿瘤细胞有大量的微绒毛,有利于细胞从周围摄入大量的葡萄糖和氨基酸。

12. 核膜(nuclear membrane) 核膜由核内膜和核外膜组成,两膜之间的腔隙称为核周隙。两膜融合处形成核孔。核外膜类似于粗面内质网,比核内膜略薄,胞质面有核糖体附着。核外膜常与内质网相连,使核周隙与内质网腔直接相通。核周隙宽约20~50nm。核内膜厚约8nm,内核膜的内表面有一层电子致密的网络状纤维蛋白质,厚约25nm,为核纤层(nuclear lamina)。核纤层由核纤层蛋白(lamin)构成,属中间纤维。核纤层维持细胞核形态还参与染色质和细胞核的组装。

核膜的另一显著特点是具有核孔复合体(nuclear pore complex)。核内、外膜彼此融合处称为核孔。

核孔呈圆形或八角形,包括:①胞质环,位于核孔复合体胞质一侧,环上有8条纤维伸向胞质;②核质环,位于核孔复合体核质一侧,上面伸出8条纤维,纤维端部与端环相连,构成笼子状的结构;③转运器,核孔中央的一个栓状的中央颗粒;④辐:核孔边缘伸向核孔中央的突出物,核孔复合体是严格控制核质之间物质交换的结构。

13. 染色质(chromatin)与染色体(chromosome) 在间期核中,染色质大部分呈分散细丝状、颗粒状和团块状。根据染色质折叠程度及功能状态,分为常染色质和异染色质。

常染色质(euchromatin)的电子密度均匀,着色浅,大部分分布在核中央,小部分可深入到核孔内侧,也有深入核仁内的。常染色质是在间期核中伸展的非卷曲部分,在代谢上很活跃。异染色质(heterchromatin)是由染色质细丝卷曲缠绕,形成大小不等的颗粒和团块,电子密度大,外无膜包裹。多聚集在核周围。按其分布可分为周围染色质、核仁相随染色质、分散染色质等。异染色质在代谢上不活跃。

染色质的一级结构是核小体串珠状纤维结构,核小体由核心颗粒和连接DNA两部分组成,核小体纤维直径为11nm。在电镜下观察的用温和方法分离的染色质是直径30nm的纤维,是由核小体螺旋化形成,构成外径30nm的中空管,此为二级结构,染色体是在此基础上再形成的更高级的结构。

染色体上的着丝粒(centromere)和着丝点(kinetochores)是两个不同的概念,前者指中期染色单体相互联系在一起的特殊部位,后者指主缢痕处两个染色单体外侧表层部位的特殊结构,它与纺锤丝微管相接触。

着丝粒含3个结构域,即:着丝点结构域、中央结构域和配对结构域。着丝点结构域:位于着丝粒的表面,由外板、内板、中间区和围绕外层的纤维冠组成。内外板的电子密度高,中间区电子密度低。内板与中央结构域的着丝粒异染色质结合,外板与微管纤维结合,纤维冠上结合有马达蛋白,为染色体的分离提供动力。

14. 核仁(nucleolus) 存在于间期核中。电镜下,核仁具有较高的电子致密度,有3个特征性的区域:①纤维中心(fibrillar centers, FC):电镜下为浅染的低电子密度区,主要成分为RNA聚合酶和rDNA rDNA 祥环上rRNA基因串联排列高速转录,产生rRNA,由此组装形成核仁,因此每个rDNA 祥环称为一个核仁组织者。②致密纤维组分(dense fibrillar com-