

组织细胞化学技术

细胞膜

【日】小川和朗 中根一穗 主编

朴英杰 等翻译

中山大学出版社

组织细胞化学技术

细 胞 膜

〔日〕小川和朗 中根一穗 主编
朴英杰 等译

翻译人员（以翻译先后为序）：

罗深秋 宁 刚 朴英杰 张景强
周翼模 韩明虎 金 政 石玉秀
刘连璞 胡 雯 王国英 张树欣
李广君

中山大学出版社

内 容 简 介

本书共十一章,前两章一般介绍了细胞膜的基本结构和基本技术。后九章重点叙述了细胞膜的组织细胞化学显示方法,包括细胞膜复合糖类、脂类、酶、细胞膜功能基、细胞膜与细胞骨架蛋白、细胞膜表面抗原、表面受体、细胞连接以及各种细胞膜组织化学特征等。全书约31万字,附图170余幅,其中光镜、电镜照片图137幅。

本书是一本细胞膜实验技术参考书。适用于医学院校、农林院校、师范大学和综合性大学生物系以及与医学、生物学有关的研究所从事细胞膜研究工作的技术人员、教学工作者及研究生参考。

组 织 细 胞 化 学 技 术

细 胞 膜

〔日〕小川和朗 中根一穗 主编

朴英杰 等译

责任编辑:罗深秋 封面设计:张景强

中山大学出版社出版发行

广东省新华书店经销

第一军医大学印刷厂印刷

787×1092毫米 16开本 印张15.25 字数31万字

1991年3月第1版 1991年3月第1次印刷

印数1-4,000

登记证号(粤)第11号

ISBN 7-306-00415-8

Q.6 定价:12.00元

執筆者 (執筆順)

藤岡厚子	近畿大学医学部助教授	足達敏博	京都大学医学部病理学教室
馬屋原宏	武田薬品工業(株)中央研究所副所長	石川裕二	琉球大学医学部助教授
藤本豊士	京都大学医学部助教授	嶋田裕	千葉大学医学部教授
藤本和	京都大学医学部講師	有松靖温	三菱化成生命科学研究so主任研究員
酒井眞弘	京都大学医学部解剖学教室	糸賀毅子	広島大学医学部第三内科
徳永正義	東海大学医学部中央電子顕微鏡室	鬼頭昭三	広島大学医学部教授
玉置憲一	東海大学医学部教授	三好理絵	広島大学医学部第三内科
尾形俊一郎	Sloan-Kettering Institute	大野陽一郎	天理よろづ相談所病院副部長
小澤政之	鹿児島大学医学部講師	貝谷久宣	岐阜大学医学部講師
小村長芳	鹿児島大学医学部教授	井出千束	岩手医科大学教授
菅沼龍夫	宮崎医科大学教授	吉村眞一	東海大学医学部細胞生物学教室
渡辺信朗	神戸大学医療短期大学部助教授	渡辺	関西医科大学解剖学教室
正田悦郎	神戸大学医学部整形外科	金村秦輔	関西医科大学教授
高橋等	弘前大学医学部助教授	上山野聰樹	大津赤十字病院部長
高鈴木信太郎	Doheny Eye Institute, University of Southern California	山科藤正孝夫	北里大学医学部教授
岩政輝男	琉球大学医学部教授	安樋端みどり	武田薬品工業(株)中央研究所
内海康文	琉球大学医学部病理学第二教室	横田貞記	高松赤十字病院部長
林久男	名古屋大学医学部講師	山下秀明	山梨医科大学助教授
城所龍一	袋井市立袋井市民病院部長	瀬口春道	山下眼科理事長
森川茂之	島根医科大学教授	佐藤厚	高知医科大学教授
原田孝之	島根医科大学助教授	山本	長野県中野保健所所長
島村和男	東海大学医学部講師	桑原	静岡市立静岡病院消化器科
名倉宏計	東北大学医学部教授	岩月	大阪府済生会中津病院副部長
福士主文	弘前大学医学部教授	宇野	川崎医科大学講師
新居志郎	岡山大学医学部講師	天野保二	日本電子(株)応用研究センター
水野敏英	岡山大学医学部教授	猪俣賢一郎	日本電子(株)応用研究センター副課長
鈴木	秋田大学医学部助教授	宮徳	東邦大学医学部教授
	東京医科歯科大学名誉教授		熊本市立熊本市市民病院部長
	東京都臨床医学総合研究所		新別府病院院長

译 者 的 话

近年来,随着细胞生物学研究的进展,组织细胞化学特别是细胞膜的组织细胞化学技术发展颇为迅速。它已成为细胞的物质交换、神经传导、信息传递、能量转换、激素作用、细胞识别、免疫、药物治疗、癌变机理等方面分子水平上结构和功能研究的最重要手段之一。

本书是由当代著名的细胞生物学,组织细胞化学专家,日本的小川和朗和中根一穗教授主编,50多名有关方面的专家和活跃在实践第一线,具有丰富经验的学者执笔完成的。书中收集了大量有关细胞膜方面的研究方法,内容充实,反映了当代最新的研究水平,是一本不可多得的细胞膜研究技术指导专著。鉴于目前国内许多学者急需开展细胞膜方面的研究但又缺乏这方面的专著,我们组织了翻译小组,经过近一年的努力,将其译成中文献给大家。如果我们的工作能对发展国内的组化工作起到某种积极作用,将感到由衷的高兴。

本书最初是以日文形式在1989年底出版的。全书共分11章,附有光镜、电镜及示意图240多幅。在翻译过程中,根据需要,删除了部分照片和参考文献。所需的照片全部集中在书的后面,以保证印刷质量。书中部分外文尚无统一的中文译法,故以英文形式列出。所有译稿统一由朴英杰、罗深秋进行了整理。

在该书的翻译出版过程中,原著主编小川和朗教授给予了热情地支持。本校陶永松副教授对译稿提出了许多宝贵意见,安连兵,肖焕才,任力同志在照片的整理及其它事务性工作中花费了大量劳动,对此,我们表示衷心地感谢。由于译者水平有限,在翻译过程中肯定会有这样或那样的缺点和错误,诚挚地欢迎读者批评指教。

主 译:第一军医大学 教授 朴英杰

一九九一年二月 广州

前 言

1984年(昭和59年)是组织细胞化学发展史上值得纪念的一年。这一年的8月5日至11日在国际组织细胞化学联盟的支持下召开了第七届国际组织化学与细胞化学会议(会议主席为赫尔辛基大学医学部Olavi Eränkö教授)。日本组织化学学会创立25年后,于10月29—30日在学会的发祥地京都召开了日本组织细胞化学学会25周年纪念学术讲演会和大会(会议主席为京都府立医科大学佐野井丰校长)。这两次学术会议都取得了圆满成功。在25周年纪念大会上除国内外组织化学知名的专家学者做专题讲演外,还举行了以神经发生组织细胞化学为题的讨论会(主持人为京都府立医科大学藤田暂也教授)。这些学术交流对推动日本组织细胞化学的发展起了极为有益的作用。1986年6月,首先在加拿大温哥华举行了第一届日美组织细胞化学会议,又接着在美国圣弗兰斯科召开了第二届会议(主持人为第27届日本组织细胞化学学会会长东海大学医学部中根一穗教授和第37届美国组织化学学会会长加利福尼亚大学Lawrence Livermore研究所Robert G. Smith博士)。

组织细胞化学是采用结构与功能在原位直接结合法研究组织、细胞以及亚细胞水平的结构及其机能,因而也是化学及生物化学机能及其动态变化关系的学科。组织细胞化学的开创可追溯到F.V. Raspail(1925, 1930)时代,虽然历史漫长但时至今日它仍然是一门各种新技术在日新月异的开发和研究的学科。应朝仓书店编辑部的要求,我们编写出版了这本面向初学者的组织细胞化学最新技术集。朝仓书店已发行了《新组织化学》、《新酶组织化学》、《病理酶组织化学》等大型组织细胞化学书籍,其中包括了作者的研究成果。这次出版计划和以往著书不同,本书的重点放在组织细胞化学技术实际应用方面,叙述上着眼于实际实验技巧、重点、注意事项,简明易懂,使其成为初学者手头指导操作的参考书。本书是由亲自进行实际实验工作的较年轻研究人员执笔。

《组织细胞化学技术》作为一大型系列全书合6册分别出版,各分册由相应领域的专家执笔。各分册内容及其编委如下:

酶(包括同功酶): 斋藤多久马, 森 昌彦, 安田健次郎, 渡边庆一;
激素与神经递质(包括相关酶): 鬼头昭三, 永津郁子, 藤田尚男, 矢内原昇;
核酸与糖(包括相关酶): 小田琢三, 平野 宽, 藤田暂也, 山田和顺;
脂质与类固醇: 川生 明, 岸野泰雄, 土山秀夫, 森井外吉;
无机物与色素: 栗 通泰, 挟间章忠, 三岛 丰, 水平敏知;
细胞膜: 名仓 宏, 藤本丰士, 马屋原宏, 村田长芳。

在这日本组织细胞化学发展中具有纪念意义的时刻出版《组织细胞化学技术》系列丛书具有深远的意义。本系列丛书若能得到组织细胞化学工作者的喜爱,编委将感到无上荣幸。

小川和朗

中根一穗

目 录

I 细胞膜的基本构造	(1)
1. 细胞膜的研究历史.....	(1)
2. 液态镶嵌模型.....	(2)
3. 细胞膜的分子构造.....	(3)
a. 脂质.....	(3)
b. 蛋白质.....	(3)
c. 碳水化合物.....	(5)
II 基本技术	(6)
1. 透射电镜的基本技术—超薄切片法.....	(6)
a. 取材和细切.....	(7)
b. 前固定.....	(8)
c. 脱水.....	(8)
d. 包埋.....	(9)
e. 厚切片和修块.....	(11)
f. 超薄切片.....	(11)
g. 捞片.....	(11)
h. 电子染色.....	(11)
2. 冷冻复型法.....	(13)
3. 冷冻反转法.....	(16)
4. 负染色法.....	(19)
5. 扫描电子显微镜观察法.....	(20)
6. 超高压电子显微镜观察法.....	(23)
a. 酶细胞化学方法.....	(23)
b. 镧法.....	(24)
c. 铁氰化钾饿固定法.....	(24)
7. 细胞膜分离法.....	(24)
a. 大鼠肝细胞膜制备法.....	(24)
b. 各种组织细胞膜制备法.....	(25)
c. 细胞膜标本的纯度鉴定.....	(26)
III 细胞膜复合糖类组织细胞化学	(29)
1. 一般糖类的显示法.....	(29)
1-1 光学显微镜法.....	(29)
a. PAS反应.....	(29)

b. 胶体(透析)铁染色法	(30)
c. 爱尔新蓝(pH2.5)染色法	(30)
d. 爱尔新蓝(pH1.0)染色法	(31)
e. 醛复红染色法	(31)
f. 高铁二胺染色法	(32)
g. 唾液酸的直接证明法	(33)
h. 唾液酸与凝集素特异性结合的证明法	(33)
i. O-乙酰化唾液酸的证明法	(34)
j. 通过甲基化-碱性水解的方法显示羧基和硫酸基	(35)
k. 利用酶法证明半乳糖和氨基半乳糖	(36)
1-2 电子显微镜	(37)
a. 高碘酸盐-硫卡巴胍-蛋白银(PA-TCH-SP)染色法	(37)
b. 透析铁染色法	(38)
c. 钉红染色法	(38)
d. 阳离子化铁蛋白染色法	(39)
e. 高铁二胺染色法	(40)
f. 利用卵白素-生物素法证明唾液酸	(40)
g. 利用卵白素-生物素法证明半乳糖残基	(41)
2. 免疫组织细胞化学显示法	(42)
2-1 荧光法	(42)
2-2 酶标记法	(44)
2-3 铁蛋白标记法	(50)
2-4 胶体金法	(53)
2-5 复合糖类抗体法	(55)
2-6 放射自显影法	(59)
3. 糖脂的显示法	(62)
a. 一般组化染色	(64)
b. 抗体的染色法	(65)
c. 利用生物毒素的染色法	(67)
IV 细胞膜脂类的组织细胞化学法	(69)
1. 膜组分的脂类检出法	(69)
2. 冷冻复型法显示膜脂质	(72)
V 细胞膜和骨架蛋白质的显示法	(75)
VI 细胞膜表面抗原显示法	(79)
1. 荧光抗体法	(79)
a. 染色标本的制备	(79)

b. 膜荧光法的实际操作	(81)
2. 酶抗体法	(84)
2-1 免疫细胞	(84)
a. 悬浮细胞表面抗原显示法	(85)
b. 冷冻切片的表面抗原显示法	(87)
2-2 肿瘤标记	(88)
3. 铁蛋白抗体法	(92)
a. 铁蛋白抗体结合物的制备	(93)
b. 铁蛋白抗体结合物的精制法	(94)
c. 铁蛋白抗体纯度和活性测定法	(95)
d. 铁蛋白抗体和标本反应的方法	(95)
4. 免疫扫描电镜法	(96)
4-1 病毒标记法	(96)
4-2 胶乳标记法	(98)
4-3 放射自显影	(100)
a. SEM-ARG的样品制作法	(101)
b. SEM-ARG的操作技术	(101)
c. 观察和几点问题	(102)
5. 纤维连接蛋白的显示法	(103)
a. 纤维连接蛋白的特性	(103)
b. 纤维连接蛋白的机能显示法	(103)
c. 纤维连接蛋白的蛋白质化学显示法	(104)
d. 纤维连接蛋白的免疫细胞化学显示法	(105)
VII 细胞表面受体的显示方法	(107)
1. 激素受体	(107)
2. 神经递质受体	(111)
2-1 乙酰胆碱受体	(111)
a. 眼镜蛇毒b显示法	(111)
2-2 α -金环蛇毒素 (α -BGT) 结合部位	(114)
2-3 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体	(116)
2-4 甲硫氨酸-脑啡肽受体	(121)
2-5 多巴胺受体	(122)
VII 细胞膜酶的显示法	(125)
1. NADPH氧化酶	(125)
2. 胆碱乙酰转移酶	(126)
3. 乙酰胆碱酯酶	(128)

3-1 乙酰胆碱酯酶活性显示法	(128)
a. Karnovsky 法	(128)
b. Lewis和Shute法	(130)
3-2 冷冻复型法	(132)
3-3 扫描电镜法	(133)
4. 碱性磷酸酶	(133)
4-1 活性显示法	(133)
a. 金属盐法	(134)
b. 偶氮色素法	(135)
c. 碱性磷酸酶活性的局部定位	(136)
4-2 免疫学显示法	(136)
4-3 扫描电镜法	(139)
5. 对硝基苯磷酸酶	(140)
a. 哇巴因敏感, 钾依赖性对硝基苯磷酸酶	(140)
b. 哇巴因非敏感, 钾非依赖性对硝基苯磷酸酶	(141)
c. H^+-K^+ -三磷酸腺苷酶	(143)
d. 酸性对硝基苯磷酸酶	(144)
6. 5'-核苷酸酶	(144)
a. 酶组织化学的显示	(144)
b. 免疫组织化学的显示	(146)
7. Mg^{2+} -三磷酸腺苷酶	(147)
8. Na^+-K^+ -三磷酸腺苷酶	(150)
9. Ca^{2+} -三磷酸腺苷酶	(154)
10. 腺苷酸环化酶与鸟苷酸环化酶	(156)
11. 碳酸酐酶	(158)
IX 示踪法观察细胞连接	(161)
1. 镧标记法	(161)
2. 过氧化物酶法	(162)
3. 酶抗原法和酶抗体法	(164)
X 细胞膜功能基的显示法	(167)
1. 氨基显示法	(167)
1-1 氢醌-TNBT法	(167)
1-2 二硫化氨甲酰化法	(168)
1-3 其他方法	(169)
2. 巯基(SH)显示法	(169)
2-1 巯基显示法	(170)

a. DDD-FBBBN 法.....	(170)
b. FBBBN 法.....	(171)
c. MO 法.....	(172)
d. MC 法.....	(173)
e. 特异性的鉴定.....	(174)
2-2 冷冻复型法.....	(175)
Ⅱ 各种细胞膜的组织细胞化学特征.....	(177)
1. 消化道上皮细胞膜.....	(177)
a. 消化道上皮样品制作时的注意事项.....	(177)
b. 消化道上皮细胞膜的细胞化学.....	(178)
2. 肝细胞膜.....	(179)
a. 碱性磷酸酶.....	(180)
b. 5'-核苷酸酶.....	(180)
c. Mg^{2+} -三磷酸腺苷酶.....	(180)
d. 钾依赖性- P^- -对硝基苯磷酸酶.....	(180)
e. Ca^{2+} -三磷酸腺苷酶.....	(181)
f. 腺苷酸环化酶.....	(181)
3. 肾、肾小管上皮细胞膜.....	(181)
4. 肺泡的上皮细胞膜.....	(183)
5. 血管内皮细胞膜.....	(186)
a. 腺苷酸环化酶 (AC) 和鸟苷酸环化酶 (GC)	(186)
b. ATP 酶, ADP 酶, AMP 酶.....	(188)
6. 神经细胞膜.....	(190)
7. 膀胱上皮细胞膜.....	(192)
a. 移行上皮.....	(192)
b. 腔侧细胞膜.....	(193)
c. 运用光衍射法及光滤过法进行腔侧细胞膜分析.....	(194)
d. 移行上皮细胞膜的组织化学.....	(196)
8. 培养的癌细胞膜.....	(198)
主要参考文献.....	(203)
后记.....	(205)
附图	

I 细胞膜的基本构造

1. 细胞膜的研究历史

对细胞膜构造的认识，随着新方法的出现而取得了巨大的进步。

光学显微镜（以下简称光镜—译者）的时代，因其分辨能力低，看不到细胞膜。但是，用生理学、物理化学方法能提示膜的存在。例如，1899年，Overton发现疏水性物质比亲水性物质更容易浸透到细胞内。因此，他认为细胞周围肯定有一个由脂质层(lipoid layer)围成的境界。Plowe用细针挑刺细胞周围，发现其具有弹性，微小的损伤容易修复，是一种与细胞其它部位的分子组成有明显不同的构造。从而证实了细胞的境界是一种实体。Gorter和Grandel将红细胞膜内的脂质抽出并展开成一层分子，发现其表面积几乎是原细胞膜的2倍。因而首先提出细胞膜是由二层极性基伸向外侧的脂质分子构成。Danielli等在研究膜的物理化学性质中发现细胞膜表面的张力比纯粹脂肪滴的张力小，因而认为细胞膜不光具有极性基向外的脂质层，还有覆盖在两侧的蛋白质。于是，他提出了膜的模型（图I.1）。这些研究都是在能直接看到膜构造之前的年代里开展的。随着电子显微镜（以下简称电镜—译者）的发明，使看到细胞膜真实面貌的想法变成了现实。Robertson在雪旺氏细胞髓鞘形成过程的研究中，发现髓鞘都是由双层细胞膜反复卷曲而成。他将一层细胞膜称之为单位膜(unit membrane)。单位膜具有暗、明、暗三层构造。Robertson(1969)根据这些结果，结合当时兴起的X线衍射、偏光显微镜等研究所见，提出了与Danielli、Davson模型有相似点的另一模型，即膜是连续性脂质双分子层，分子的极性基伸向各自的外侧，双分子层外侧覆盖着性质有差异的非脂质性物质，细胞质侧是蛋白质，外侧可能是亲水性较强的糖链。这种模型称为单位膜模型。它能较好地说明膜的稳定性和电现象，在当时得到了广泛支持。可是，后来发现单位膜不光是三层构造（模型的主要依据），还有球状亚单位。大部分脂质抽掉之后，三层构造还能看到。电镜像没有显示出脂质分子构造。甚至有人认为以前广泛接受的Gorter和Grandel论述的脂质双分子层，是从一些重复性错误实验中得到的结果，因为从红细胞膜中抽出的脂质、形成双分子层后，不足以覆盖细胞的表面。因此，对单位膜的学说产生了疑问。与连续性脂质双分子层是基本骨架的模型相反，有人提出了新的模型，即膜是球状物多次重复后形成的。例如，Lucy观察了人工膜之后，认为膜是由脂质小球（分子团）构成。Benson提出了亚单位学说。该学说认为蛋白质与脂质之间可通过疏水性结合形成膜的亚单位。亚单位中的蛋白质构成基本骨架，脂质分子伸入骨架中。这种脂蛋白性亚单位多次重复即构成了膜（图I.2）。

以后，随着新研究方法的出现，对膜模型的研究也有了进一步的发展。例如，由于

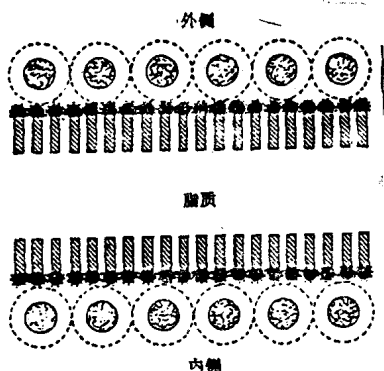
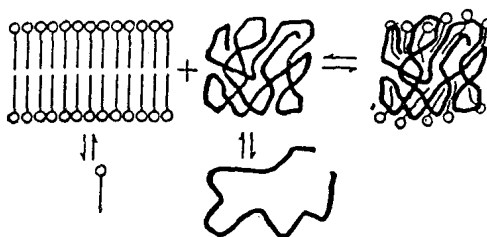


图 I. 1 Danielli和Davson (1935) 的膜模型
膜由脂质层和两侧的球状蛋白质组成, 脂质层的厚度各处不一。



图I. 2 Benson (1966) 的膜模型
蛋白质框架内, 脂质疏水性结合, 形成脂
蛋白亚单位。

膜提纯方法的改进, 弄清了膜的化学成分除了蛋白质和脂质外还有少量碳水化合物。自旋标记和X线衍射证明了大多数膜的脂质分子形成双层。圆偏光二色法(CD)、红外线吸收光谱等方法发现多数膜蛋白不仅是伸展形, 还有 α -螺旋状。冷冻断裂方法的出现对确定膜的模型做出了很大的贡献。该法能显示出膜的断裂面(脂质双层之间)中镶嵌着球状蛋白质。这些球状蛋白质的分布状态因条件不同而有变化, 因此提示膜具有流动性。换句话说, 膜不光具有稳定性一面, 还具有动力学构造的一面。用电子自旋共振法(ESR)研究发现, 脂质起着流动性基质作用。Singer和Nicolson在上述新见解的基础上, 提出了液态镶嵌模型(fluid mosaic model)。这个模型能较好地说明膜化学、性质、形态及功能。所以, 至今得到广泛的支持。]

2. 液态镶嵌模型(fluid mosaic model)(Singer和Nicolson 1972)

这个模型的基本内容是, 膜的基本构架是二层不连续的脂质分子, 分子之间镶嵌着球状蛋白质(图 I. 3)。脂质、蛋白质分子均具有亲水、疏水性二部分。亲水性部分朝向外

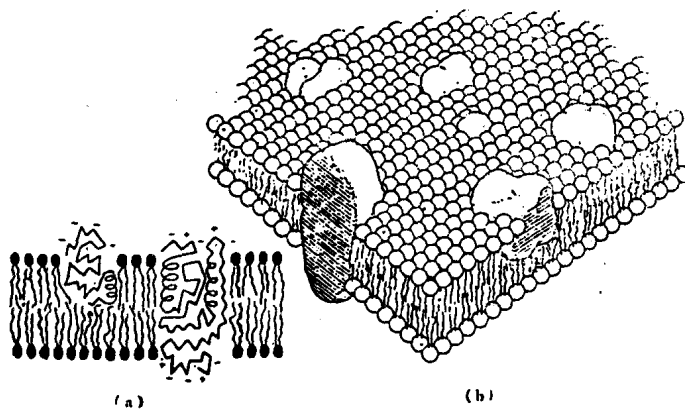


图 I. 3 液态镶嵌模型 (Singer和Nicolson, 1972)
脂质双分子层与球状蛋白质呈镶嵌状排列 a. 横断面 b. 立体图

侧,疏水性部分伸向内部。双层脂质分子借彼此的疏水部分形成疏水性结合。膜的脂质构造在通常温度下呈液晶态;因而具有流动性。镶嵌在脂质分子之间的球状蛋白质可沿着这个构架移动。二者之间的关系,有点象海面(脂质)上浮动着冰山(蛋白质)。碳水化合物与脂质或蛋白质分子结合,露出在膜的外表面。

现在,膜的基本构造均以液态镶嵌模型加以解释。但是,也有部分人认为这种模型还过于简单,因而提出了不少补充性意见。例如,对脂质、蛋白质的流动性(Kimelberg 1977),膜的非对称性(Rothman和lenard 1977)等方面进行了更为详细的描述。

3. 细胞膜的分子结构(Bretscher 1985)

所有的细胞膜均由脂质、蛋白质及少量碳水化合物组成。虽三者之间的比例因细胞种类不同而有差异,但脂质和蛋白质一般约各占膜干重的50%,碳水化合物占1~10%。

a. 脂质

膜的脂质主要有三种:磷脂、糖脂和胆固醇。三者均是双性分子,亲水基伸向外面,疏水基朝向内部,从而形成脂质双分子层。脂质在常温下呈液晶状态,分子可沿着膜面平行移动。流动性因脂肪酸链的长度、饱和度不同而有差异。脂肪酸链短、不饱和性大的脂质分子在低温下也有流动性。另外,胆固醇对膜的流动性也有很大影响。细胞膜中有不少胆固醇;其中一部分是防止膜在低温下转变成凝胶状。所以,胆固醇在脂质双分子层的力学稳定性方面起重要作用。在不能合成胆固醇的细胞系中,不补充足够胆固醇时,细胞可发生溶解。一般认为,补充的胆固醇进入细胞膜后与磷脂一起维持膜的稳定性。

脂质并不是在膜的所有部位都是一样的自由流动。在某些内在性蛋白质的周围,脂质和蛋白质结合得比较牢固,活动也因此受到影响。这类蛋白质的活性化也需要周围这些脂质的协助。另外,脂质双层分子的一层向另一层移动,即触发转移(flip-flop),它的移动频率非常低,只有平行移动的约 10^{-10} 次。

有报告说脂质所具有的流动性,牵引了蛋白质的平行移动,也可调节某种酶的活性。在细胞增殖过程中,脂质的流动性也起到重要作用。另外,膜的高度粘性能控制物质的进出。尽管有上述了解,但对膜所具有流动性的机能还需要进一步阐明。

在脂质双层分子中,每层中脂类成分的比例有很大的差别。例如,人红细胞膜外层脂质分子以磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂为主,内层则主要是磷脂酰丝氨酸和磷脂乙醇胺。糖脂只有外层才有。这种非对称性导致了膜内、外两层分子不同饱和度(头部有胆碱的脂肪酸链饱和度高),不同的电荷(内层的磷脂酰丝氨酸带负电)。脂质的非对称性能促使蛋白质配备在正确的位置,因而与膜的机能有很大关系。因为触发转移发生的频率非常低,所以,膜形成时产生的脂质非对称性,在以后的期间也不会有什么变化。

b. 蛋白质

膜的基本构架是脂质双分子层,但细胞内外物质的运输、对激素及化学物质应答和

传递以及以酶的形式产生触媒作用等细胞膜的多数功能均由蛋白质完成。因此，细胞膜蛋白质的种类和数量随着膜的机能不同而有很大差异。

镶嵌在膜中的蛋白质，多数贯通整个脂质双分子层，亲水性部分露出在膜的内外两面（图 I .4）的（1）、（2）。这种贯通型蛋白质又分二种：一种是以肽链形式一次性横过脂质双层，象红细胞膜的血型糖蛋白、胰岛素、低密度脂蛋白（LDL）的受体等。另一种以红细胞膜的带3蛋白质为代表，肽链反复折叠，来回穿梭于脂质双分子层形成类似球状的结构。这些分子的中央或几个分子结合的中央，具有亲水性通道。因而这类蛋白质一般被认为是属于运输型。面对着膜内通道的是一些亲水性氨基酸，其它部位是疏水性氨基酸。冷冻蚀刻法显示的膜断裂面上颗粒中较大的那部分，可能就是这些运输型蛋白质。有些蛋白质不贯通膜，而是在膜的一侧露出亲水部分。胞质侧露出的蛋白质，与脂质双分子层细胞质侧的脂肪酸链形成共价键并结合在膜上（图 I .4的（4））。这样的共价键在贯通型蛋白质中也能见到如图 I .4的（1）。一般认为这种结合比疏水性结合更为牢固。近年来已经清楚，露出到细胞外表面的蛋白质如图 I .4的（3）在糖链的介导下与脂质双层外层分子的磷脂酰肌醇形成共价键（Ferguson和 Williams 1988）。磷脂酰肌醇是一能对某种激素产生反应的脂质，所以它在生物膜内与蛋白质机能上的关系正日益受到人们的关注。上述蛋白质都可以在用表面活性剂和有机溶剂破坏脂质之后从膜中抽提出来。这样的蛋白质叫嵌合性或内在性蛋白质（integral protein 或 intrinsic protein）。

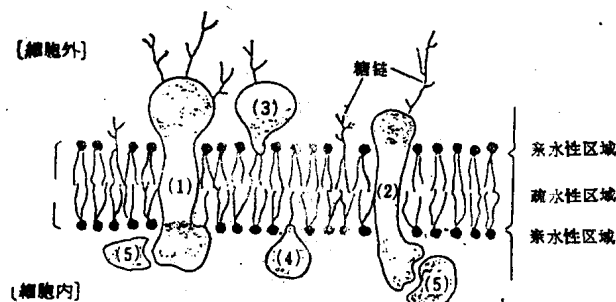


图 I .4 细胞膜模式图。重点表示蛋白质的结合方式

（1）、（2）都是贯通膜、并有亲水性部分露出在膜两侧的蛋白质，其中（1）在细胞质侧与脂肪酸形成共价键，因而与膜的结合更为牢固。（3）、（4）是一些只在细胞膜的某一侧露出的蛋白质。（3）与磷脂酰肌醇和糖链结合，形成共价键，露出在细胞外表面。（4）是露出细胞质侧的蛋白质，与脂质双分子层细胞质侧的脂肪酸形成共价键。（1）-（4）是内在性蛋白质，（5）是外在性蛋白质，与内在性蛋白质之间形成非共价键。

另一部分蛋白质不和脂质的疏水性部分直接结合，而通常是与内在性蛋白质形成非共价键，间接地与膜结合。用盐抽提之类较温和的方法就能使其游离。这类蛋白质叫外在性蛋白质（peripheral protein 或 extrinsic protein），如图 I .4中的（5）。用快速深度冷冻蚀刻法也可看到这类蛋白质露出在膜的表面。

蛋白质按一定方向组合在膜中。酶蛋白的活性部位一般特定地朝向某个面。外在性蛋白质结合在哪个面由其本身的性质决定。贯通型蛋白质通过其N、C两个末端决定方向，糖蛋白的糖链不会出现在细胞质侧，这种内、外明显的非对称性，使得触发转移不能发

生。

蛋白质也可在脂质双层分子内沿着膜平行方向移动。正因为此,这些被合成后参入膜构造的蛋白质,随着时间的推移,所在位置有些变化。另外,在细胞分裂时对膜的均匀分配也有作用。然而,蛋白质不能完全自由地移动,它受到某种因素的限制。这种限制主要来自蛋白质之间的相互作用力。例如,缝隙连接中的蛋白质密集成圆盘状,膜内的蛋白质通过相互作用维持着各自的位置关系,使得这样巨大分子集合体几乎不会有什么移动。在细胞连接中,相邻两个细胞的蛋白质也可相互作用制约着蛋白质的运动。这种作用可看成是细胞外蛋白质相互作用的例子。在细胞质侧,某些外在性蛋白质与内在性蛋白质形成网状联系制约蛋白质的移动,甚至可通过细胞质内肌动蛋白等细胞骨架影响其活动。在上皮细胞侧面的紧密连接中,顶部和基底部的膜成分是不一样的。尽管在各自区域可以移动,但两个部位都能维持各自的特征,决不会相互混淆。

C. 碳水化合物

碳水化合物与蛋白质或脂质结合,以糖蛋白或糖脂的形式存在于膜上。露出在膜外表面的蛋白质都是糖蛋白。糖脂只占脂质很少一部分。碳水化合物只分布在膜外表面,因此具有明显的非对称性(图1.4)。因形态上常以树枝状或羽毛状伸出到膜外,故称为糖衣或外衣(glycocalyx或surface cell coat)。构成膜的单糖主要有半乳糖、甘露糖、岩藻糖、氨基半乳糖、葡萄糖及唾液酸等。但是糖蛋白、糖脂的低聚糖侧链上可由少数几种单糖组合成非常多的形式,结合形式也千变万化,因而难以确定其构造。一般讲,糖侧链的末端是唾液酸,膜表面带负电荷。靠近蛋白质的单糖一般是氨基半乳糖。

这些糖链的功能尚不很清楚,估计与细胞各种各样的识别有关。例如,做为输送某种蛋白质正确路线的标记。关于此,在往溶酶体内输送酶方面已得到了肯定的回答。糖蛋白糖链中6-磷酸甘露糖就是一种往溶酶体内方向输送的标记物。另外,老化的红细胞,糖蛋白中的唾液酸减少、半乳糖露出而被识别。某种血型抗原位于糖蛋白上。另外,糖蛋白还可能是病毒和植物凝集素的受体并在细胞间接触和接触抑制等多种识别中起重要作用。

了解细胞膜构造的知识,实际上是查找膜研究的历史。因此,上面所讨论的只是到目前为止人们对膜认识的情况。随方法论的进步而发生。膜研究也不例外。在形态学研究中,电镜的出现,制作标本方法的改进,冰冻蚀刻方法的开发对膜构造的研究带来了巨大的进步。各种物理、化学分析方法的应用,又使我们对结构和功能有了更深一步的了解。今后,在考虑各种细胞的机能时,应注意细胞膜各部分分化的有关内容。另外,在研究中,用形态学结合组织化学方法,可获得有关膜的新知识。

II 基 本 技 术

1. 透射电镜的基本技术—超薄切片法

用透射电镜观察的生物材料标本，一般只有几百个Å的厚度（超薄切片）。如果切片太厚，在通常的加速电压（50~80KV）下，电子束无法透过。假如提高加速电压以增强电子束的穿透能力，细胞内部的构造也会重叠。因此，厚切片不适合通常的观察。

表Ⅱ.1列出了一般实质性细胞超薄切片制作的过程。培养细胞、游离细胞及离心后细胞等特殊标本制作的时候，应根据情况采用特殊方法。这里因篇幅所限，恕不多述培养细胞的电镜细胞化学方法可参阅文献（马屋原，1976；1977，7）。表Ⅱ.1所列出的超薄切片法包括组织通常的固定、脱水及包埋方法（a~c）和未经固定的组织首先冷冻、然后切片的方法（d）。前者中的固定法又有三种手段。下面按a→d顺序简单说明一下。

表Ⅱ.1 超 薄 切 片 过 程

(a) 浸泡固定法	(b) 灌注固定法	(c) 快速冷冻置换法	(d) 冷冻超薄切片法
取 材 ↓ 细切（固定液中） ↓ 前 固 定 ↓ 洗 净 ↓ （细胞化学反应） ↓ 洗 净 ↓ 后 固 定（OsO ₄ ） ↓ 脱水（组织块染色） ↓ 包 埋 ↓ 超 薄 切 片 ↓ 电 子 染 色 ↓ 观 察	灌 注 固 定 ↓ 取 材 ↓ 细切（固定液中） ↓ （进一步固定） ↓ （细胞化学反应） ↓ （洗 净） ↓ 后 固 定（OsO ₄ ） ↓ 脱水（组织块染色） ↓ 包 埋 ↓ 超 薄 切 片 ↓ 电 子 染 色 ↓ 观 察	取 材 ↓ 细 切 ↓ 快 速 冷 冻 ↓ 脱水及固定（在含有 丙酮的OsO ₄ 中） ↓ 包 埋 ↓ 超 薄 切 片 ↓ 电 子 染 色 ↓ 观 察	取 材 ↓ 细 切 ↓ 快 速 冷 冻 ↓ 超薄片切（冷冻切片） ↓ 细胞化学反应及电子染色 ↓ 观 察

（1）浸泡固定法：组织细切后，浸泡在固定液中达到固定的目的，这是一种最普通的方法。但因固定液只能从表面浸透，组织内部的固定往往不理想。另外，某些取材时需要时间的组织（如中枢神经等）、不易细切的组织（如骨、视网膜、睾丸等）也难以固定得很理想。