

青 ★ 年 ★ 科 ★ 学 ★ 家 ★ 文 ★ 库

THE SERIAL BOOKS WRITTEN
BY YOUNG SCIENTISTS

定量细胞学 和细胞化学技术

徐根兴 著



内 容 提 要

本书主要论述细胞学和细胞化学的定量技术及基本方法。系统介绍了细胞和细胞器内酶、蛋白质、核酸、基因、糖类、脂类、离子、生物胺等物质的图象分析、形态立体学测量、细胞光度测量、X射线微区分析和超微结构定位方法。本书概述了细胞、细胞器和细胞内物质的二维、三维形态参数、光密度参数、色度参数和纹理参数的计算及意义。

本书可供从事细胞生物学、细胞化学、病理学、肿瘤研究、图象分析、生物医学工程、分子生物学、生理学、动物学、植物学、电子显微镜学、形态测量学等领域的教师、科研工作者参考，也可作为高等院校高年级学生和研究生的教学参考书。

SUMMARY

This book mainly discusses quantitative techniques and basic methods of cytology and cytochemistry. It systematically presents some methods concerning image analysis, morphometry and stereology, cell photometry, X-ray microanalysis and ultrastructural location on enzyme, protein, nucleic acid, gene, carbohydrate, lipid, ion, biogenic amine in cells and organelles, and a general discussion on the calculation and the meaning of two dimensional and three dimensional morphometric parameters, optical density parameters, colored density parameters and veined parameters of cells, organelles and cell contents is also involved.

This book is provided to teachers and researchers who are interested in the following scientific subjects, including cytology, cytochemistry, pathology, tumor study, image analysis, biomedicine engineering, molecular biology, physiology, zoology, botany, electron microscopy and morphometry. It can be also used as a reference book for senior students and postgraduates in institutes and universities.

《青年科学家文库》评审委员会

顾问：王大珩 杨振宁

主任委员：高景德

副主任委员：高潮 刘东生 卢良恕 丁石孙
鲍奕珊

委员：按姓氏笔画排列

王寿仁	王泽九	石元春	叶耀先
田光华	许翔	杨芙清	吴博
何耀坤	张锐生	陆道培	陈运泰
陈佳洱	陈章良	罗伟	赵玉秋
赵柏林	俞鸿儒	姜东华	顾方舟
高为炳	阎隆飞	雷天觉	黎乐民

祖国的希望 未来的曙光

——寄语青年科技工作者

王大珩

翻开吉林科学技术出版社送来的《青年科学家著作丛书》书目及作者名单，一个个自强好学，勇于探索创新的青年人仿佛就在眼前，使我欣慰，感到后生有望。所以在《丛书》编辑出版之际，我很乐于借此机会，同广大青年科技工作者讲几句共勉的话。

这些年来，一大批在五星红旗下诞生，成长起来的年轻科技工作者崭露头角，在面向国民经济主战场的应用研究和在基础科学以及高新技术研究等诸多方面取得优异成绩，有的跻身国际领先地位，或达到国际先进水平，有的填补国内空白，这些成果对推动科学技术进步，发展国民经济起到了重要作用。为鼓励青年科技工作者的科学研究和发明创造，中国科学技术协会、中国科学院分别设立了青年科技奖和青年科学家奖，规定每两年评选一次。首届青年科技奖评出94名，首届青年科学家奖评出25名，他们是从全国数以百万计的青年科技工作者中层层遴选出的佼佼者。

在此基础上，经过中国科协和中国科学院的推荐，吉林科学技术出版社编辑出版首届部分获奖者的著作，并获得长白山学术著作出版基金的资助，这对广大青年科

技工作者是很大的鼓舞。出版社关心青年科技工作者的成长是值得赞扬的。

当今，在激烈的国际竞争中，重要的是看一个国家的综合国力，而其中重要的一个方面是科学技术的进步，所以各国都把科学技术作为推动经济发展和社会进步的重要手段。我国是一个拥有十一亿人口的大国，经济还很落后，但是我们有志气、有能力振兴中华，立足于世界民族之林。实现这样的宏愿，要靠我们几代人的艰苦奋斗。中国科学技术的兴旺发达要靠我们老中青科技工作者团结合作，但归根到底要靠你们青年人。长江后浪推前浪，一代更比一代强。党和人民把国家的前途、民族的命运寄托在你们青年人身上，正如江泽民同志所说：“你们是祖国的希望所在，是中国未来的曙光。”

我们这些人都已年逾古稀，要你们接好班，要有理想、有志气。一个人也好，一个民族也好，都要有一点精神，要有使命感，要有民族自强心，要为国家、为民族争口气，奋发向上，勇于进取；作为优秀的青年科技人才，除业务上有突出成就外，还要有不计名利、无私奉献的高尚精神，现在尤其要提倡这种精神，还要有求实的科学态度，尊重知识，尊重他人的劳动；你们还要发扬中华民族的美德，那就是要有集体主义精神，要团结协作，自力更生，艰苦奋斗，不折不挠地去拼搏，满怀希望，开拓未来！

1990年2月

序

自然科学的进步实质上是方法论的进步，新技术和新方法的建立可推动学科的发展和研究的深入。细胞学是一门古老的科学，自细胞学说的提出至今已有 160 多年的历史。随着电子显微镜、免疫学、分子生物学、现代物理学和化学、计算机技术的迅速发展以及向细胞学领域的渗透，使细胞形态学从定性向定量方向发展，促进了细胞学的发展和应用。

国内自 60 年代开始，虽已有少数有关形态计量学方面的著作，但由于 10 年动乱的干扰，影响了该学科的发展，近几年来细胞学和细胞化学的定量技术才得到重视。可是作为一门新的方法学或新的学科，细胞学和细胞化学的定量技术尚处于探索和发展的阶段，有些方法尚不完善。

本书是我国第一部正式出版的较系统的细胞学和细胞化学定量技术专著，对促进细胞形态学从定性描述过渡到定量表达起到了推动作用。

徐根兴同志多年来从事定量细胞学和定量细胞化学方面的研究，曾获得过国家级、军队级和省级十多项科技成果奖，发表过不少有新意的论文。此书主要论述了细胞学和细胞化学的定量技术及基本原理，系统介绍了细胞和细胞器内酶、蛋白质、核酸、基因、糖类、脂类、离子、生物胺等物质的定量测定方法。此书取材繁博、立论充实、见解通达、文字流畅，是一本理论与实践并重，方法和经验相辅，有较高学术水平的专著。可作为从事生命科学和医学科学的教师、科研工作者、以及高等院校的学生和研究生十分有用的参考书。我们对此书的问世，以及由于此书出于

青年科技工作者之手，而感到由衷地高兴。中国科学技术的兴旺发达要靠老中青科技工作者团结合作，而青年科技工作者是本世纪末和下世纪初科技发展的希望。我们希望更多的青年科技工作者著书立说，为中国科技的振兴作出不懈的努力。我们应当多多扶持青年科技工作者，使他们更快地成长。

中国科学院学部委员、南京大学教授 张淑仪
国家教委教材编审委员会细胞生物学
编审组副组长、南京大学教授 朱洪文

1992年5月

前 言

细胞是人体的形态结构和生命活动的基本单位。19 世纪 30 年代两位德国学者提出细胞学说之后,至今已有 160 多年的历史。当时,恩格斯就对细胞学说给予了很高的评价,认为是 19 世纪自然科学上三大发现之一。而今天,对细胞的研究在生命科学和医学中更具有重要的地位和意义。而对细胞的研究每前进一步都是以新仪器、新技术、新方法为前提的,随着电子显微镜、免疫学、分子生物学、现代化学、物理学技术和计算机技术的迅速发展及向细胞学领域的渗透,人们已采用多学科、多种先进技术来研究人体的正常和异常细胞,综合分析和阐明细胞的结构与功能、增殖与分化、遗传与发生、正常与疾病之间的关系等多方面的问题。从而产生了经典细胞学与现代细胞生物学相结合、形态与功能相结合、定性与定量相结合、动态与静态相结合、二维与三维相结合。光镜与电镜相结合、细胞水平与分子水平研究相结合、基础与应用研究相结合等多种先进技术手段和研究方法。这些技术方法应用于对细胞及细胞内各种成分的研究,是近代细胞研究高科技发展的产物。适应这一发展趋势,目前细胞形态学和细胞化学研究已从定性向定量水平发展,这也是细胞生物学领域高科技发展的必然结果。

自然科学的进步实质上是方法论的进步。新方法的确立可引导我们叩开未知世界的大门。本书介绍了当前国内外细胞和细胞化学定量技术的发展情况和基本方法,这些技术方法已被应用于生物医学工程、图象分析、病理学、肿瘤学、分子生物学、生理学、动物学、植物学、电子显微镜学、形态测量学及医学、农学等众多领域的研究之中,成为一门颇有生命力和吸引力的技术。随着微型计算

机的应用、图象分析技术的发展、生命科学高科技的发展及多学科技术的交叉,可望促进细胞学和细胞化学定量测定技术的进一步发展,成为一门崭新的学科或技术。本书为这一发展作一初步阐述,仅起一种抛砖引玉的作用。

本书是在为南京大学生物系研究生开设的“电镜细胞化学”课程编写的讲义基础上,综合作者近年来完成或合作完成的16项省级、军队级和国家级科技奖(已批准14项,2项待批)和一些文献综合而成。本书中许多技术方法是作者创立、改进、或亲自实践验证过的。由于篇幅有限,且这一领域的技术方法较多、发展迅速,本书不可能包罗所有新的技术方法。并且,作为一门新学科或新技术,往往不可避免地存在一些问题,一些名词、观点、公式尚未得到统一或公认,有待同行和专家讨论、修改,共同促进细胞学和细胞化学从定性向定量发展,为生物医学众多领域的科研或临床应用发挥作用。

在此,作者特别感激我的导师朱洪文教授对我科研上的指导和对该书的审稿,感谢学部委员张淑仪教授和朱洪文教授为该书写序。感谢中国科协、中国动物学会、中国解剖学会、江苏省科协、江苏省动物学会对我科研上的支持和帮助。感谢国家自然科学基金会、海军后勤部和中国人民解放军南京医学高等专科学校首长的支持与资助。感谢吉林科学技术出版社和长白山学术著作出版基金会的大力支持和帮助。本书中引用了许多文献资料,涉及许多中外学者,借此向他们表示衷心感谢。

限于作者水平,加之定量细胞学和细胞化学技术又是一门新的学科和技术,故本书错漏之处在所难免,衷心希望专家、朋友和广大读者给予批评指正。

徐根兴

1992年12月

目 录

第 1 章 绪论	(1)
1. 1 定量细胞学和细胞化学技术发展概况	(2)
1. 2 定量技术简介	(3)
第 2 章 图象分析仪在定量技术中的应用	(5)
2. 1 图象分析仪的结构	(6)
2. 1. 1 图象的数字化	(6)
2. 1. 2 图象分析仪组成	(9)
2. 1. 3 彩色图象分析仪构成	(12)
2. 2 图象处理的基本方法	(14)
2. 2. 1 图象预处理	(14)
2. 2. 2 图象变换	(15)
2. 2. 3 图象平滑	(15)
2. 2. 4 图象增强	(15)
2. 2. 5 图象分割	(16)
2. 2. 6 图象识别	(16)
2. 2. 7 伪彩色和彩色图象处理	(16)
2. 2. 8 图象分析	(16)
2. 2. 9 三维形态特征提取	(17)
2. 3 图象分析仪定量测定方法	(17)
2. 3. 1 二维几何参数的测量	(17)
2. 3. 2 灰度参数测量	(25)
2. 3. 3 色度参数测量	(30)
2. 3. 4 纹理参数测量	(30)

2. 3. 5 扫描电镜图象分析	(31)
第3章 细胞形态计量学	(35)
3. 1 细胞形态计量的基本方法	(36)
3. 1. 1 二维图象与三维结构关系	(36)
3. 1. 2 细胞群体和抽样测量	(38)
3. 2 细胞形态参数测量和计算	(39)
3. 2. 1 测试系统	(39)
3. 2. 2 面积、周长的点计数法	(41)
3. 2. 3 体密度的形态测量	(44)
3. 2. 4 核质比的形态测量	(45)
3. 2. 5 偏性抽样误差时核体密度的校正	(46)
3. 2. 6 面密度的形态测量	(47)
3. 2. 7 比表面的形态测量	(49)
3. 2. 8 平均截距与比表面	(50)
3. 2. 9 比膜面与面密度	(50)
3. 2. 10 长度密度的形态测量	(51)
3. 2. 11 数密度和面数密度的形态测量	(52)
3. 2. 12 轴比的形态测量	(56)
3. 2. 13 平均直径的形态测量	(57)
3. 2. 14 平均体积的形态测量	(59)
3. 2. 15 平均表面积的形态测量	(59)
3. 2. 16 圆偏度和圆球度的形态测量	(60)
3. 3 误差的计算	(61)
3. 4 图象分析中的体视学测量公式	(65)
3. 5 微血管内皮细胞的图象分析和体视学测量	(69)
第4章 定量细胞化学技术及应用	(75)
4. 1 细胞化学反应的图象定量分析和体视学测量	(77)
4. 1. 1 细胞化学反应的图象定量测量	(77)
4. 1. 2 细胞化学反应的体视学测量	(80)

4. 2	细胞光度测量在定量技术中的应用	(82)
4. 2. 1	吸收光度测量和显微分光光度计	(83)
4. 2. 2	显微荧光测量	(84)
✓ 4. 2. 3	流式细胞光度计的原理及应用	(85)
4. 3	X 射线微区元素分析在定量细胞化学中的应用 ...	(96)
4. 3. 1	X 射线微区分析的基本原理	(97)
4. 3. 2	X 射线微区分析的基本方法	(98)
4. 3. 3	X 射线微区分析的一般操作步骤	(99)
4. 3. 4	细胞化学的 X 射线微区元素分析	(101)
4. 4	细胞化学反应的其它定量方法	(104)
4. 4. 1	显微偏光光度测量	(104)
4. 4. 2	相差和干涉显微测量	(105)
4. 4. 3	激光扫描显微镜测量	(105)
4. 4. 4	扫描隧道显微镜测量	(106)
4. 4. 5	积分微象测密术	(106)
第 5 章	酶细胞化学技术	(108)
5. 1	酶细胞化学定义	(108)
5. 2	酶细胞化学基本原理	(109)
5. 2. 1	铅法	(110)
5. 2. 2	偶联偶氮法	(110)
5. 2. 3	铁氰化钾还原法	(111)
5. 2. 4	四唑盐法	(111)
5. 2. 5	DAB 法	(112)
5. 2. 6	钼法	(112)
5. 3	酶细胞化学的一般操作步骤	(112)
5. 3. 1	影响酶反应的一些因素	(114)
5. 3. 2	取材和固定	(115)
5. 3. 3	切片	(119)
5. 3. 4	孵育	(122)

5. 3. 5	后固定	(124)
5. 3. 6	脱水、包埋、超薄切片	(124)
5. 3. 7	人为产物	(126)
5. 3. 8	对照实验	(126)
5. 4	水解酶的细胞化学方法	(127)
5. 4. 1	碱性磷酸酶 (ALP)	(128)
5. 4. 2	酸性磷酸酶 (AcP)	(131)
5. 4. 3	非溶酶体酸性磷酸酶	(133)
5. 4. 4	胞嘧啶单核苷酸酶 (CMPase)	(134)
5. 4. 5	酸性单核苷酸酶	(135)
5. 4. 6	5' -核苷酸酶 (5' -Nase)	(136)
5. 4. 7	葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase)	(137)
5. 4. 8	3' 5' -环核苷酸磷酸二酯酶	(138)
5. 4. 9	硫胺素焦磷酸酶 (TPPase)	(139)
5. 4. 10	核苷二磷酸酶 (NDPase)	(140)
5. 4. 11	肌苷二磷酸酶 (IDPase)	(141)
5. 4. 12	尿嘧啶核苷二磷酸酶 (UDPase)	(142)
5. 4. 13	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶 (NADPase)	(142)
5. 4. 14	腺苷三磷酸酶 (ATPase)	(143)
5. 4. 15	Ca^{2+} -ATP 酶	(144)
5. 4. 16	Mg^{2+} -ATP 酶	(145)
5. 4. 17	Na^{+} - K^{+} -ATP 酶	(147)
5. 4. 18	腺苷酸环化酶 (ACase)	(148)
5. 4. 19	酯酶	(150)
5. 4. 20	脂酶	(151)
5. 4. 21	乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶 (AChE 和 ChE)	(151)
5. 5	氧化还原酶	(153)
5. 5. 1	琥珀酸脱氢酶 (SDH)	(154)
5. 5. 2	乳酸脱氢酶 (LDH)	(155)

5. 5. 4	过氧化物酶	(158)
5. 5. 5	D-氨基酸氧化酶 (D-AAOX)	(159)
5. 5. 6	α -羟酸氧化酶 (α -HAOX)	(160)
5. 6	转移酶	(161)
5. 6. 1	胆碱乙酰化酶 (ChAc)	(162)
5. 6. 2	糖原合成酶	(164)
5. 7	异构酶和裂解酶	(165)
5. 7. 1	尿嘧啶核苷二磷酸葡萄糖醛酸表异构酶	(165)
5. 7. 2	柠檬酸合成酶	(166)
5. 8	酶细胞化学定量测定	(167)
第 6 章	免疫细胞化学技术	(170)
6. 1	PAP 技术	(171)
6. 1. 1	PAP 法的基本原理	(171)
6. 1. 2	PAP 复合物的制备	(171)
6. 1. 3	PAP 法操作步骤	(174)
6. 2	ABC 技术	(175)
6. 2. 1	ABC 法的基本原理	(175)
6. 2. 2	ABC 法的操作步骤	(176)
6. 3	胶体金标记技术	(178)
6. 3. 1	胶体金的制备	(179)
6. 3. 2	胶体金制备注意事项	(181)
6. 3. 3	免疫金探针的制备	(182)
6. 3. 4	光镜免疫金银染色 (IGSS)	(185)
6. 3. 5	光镜彩色免疫金银法 (CIGSS)	(187)
6. 3. 6	透射电镜免疫金染色 (IGS)	(188)
6. 3. 7	扫描电镜免疫金标记	(190)
6. 3. 8	免疫电镜双重标记和多重标记	(191)
第 7 章	核酸细胞化学	(196)
7. 1	核酸的三氯化铟染色法	(196)
7. 2	核酸的钨酸钠染色法	(197)

7. 3	DNA 的 Feulgen-六亚甲四胺银染色法	(198)
7. 4	DNA 的 Feulgen-Shiff-乙醇铀染色法	(199)
7. 5	DNA 的钼-胺染色	(200)
7. 6	RNA 的选择性染色	(201)
7. 7	核仁组成区嗜银蛋白的银染法	(202)
7. 7. 1	AgK-NOR 染色法	(203)
7. 7. 2	Ag-NOR 颗粒计数及图象定量分析	(203)
7. 8	DNA 差别染色法	(204)
7. 9	核酸定量细胞化学	(205)
7. 9. 1	核酸定量分析方法	(206)
7. 9. 2	肿瘤 DNA 定量细胞化学的临床应用	(206)
第 8 章	蛋白质细胞化学技术	(209)
8. 1	蛋白质的二硝基氟苯法	(209)
8. 2	蛋白质的丙烯醛法	(211)
8. 3	高硫蛋白质的六亚甲四胺银法	(211)
第 9 章	糖类细胞化学	(214)
9. 1	糖蛋白的过碘酸-六亚甲四胺银法	(214)
9. 2	糖原和糖蛋白的氨基硫脲-蛋白质酸银法	(216)
9. 3	粘液的六亚甲四胺银法	(217)
第 10 章	脂类细胞化学	(218)
10. 1	保存脂类的特殊脱水包埋法	(218)
10. 2	胆固醇的 Schultz 改良法	(219)
10. 3	毛地黄皂甙保存胆固醇及超微结构定位	(220)
10. 4	磷脂的保存及超微结构定位	(222)
第 11 章	离子细胞化学技术	(223)
11. 1	钙离子的焦锑酸盐法	(223)
11. 2	磷酸盐离子的超微结构定位	(225)
11. 3	氯离子的银沉淀法	(226)
11. 4	重金属的硫化物-银法	(227)

第 12 章 生物胺细胞化学	(229)
12. 1 生物胺的重铬酸盐法	(229)
12. 2 生物胺的丙烯醛-重铬酸盐法	(230)
12. 3 中枢神经组织中胺的超微结构定位	(231)
12. 4 生物胺的嗜铬反应	(231)
第 13 章 细胞原位杂交技术	(233)
13. 1 原位杂交一般操作步骤	(234)
13. 1. 1 固定	(234)
13. 1. 2 探针的制备	(235)
13. 1. 3 原位杂交条件的控制	(237)
13. 2 生物素标记 DNA 探针的原位杂交法	(238)
13. 3 原位杂交技术的一些进展	(241)
附 录 常用缓冲液等溶液的配制	(244)
参考文献	(250)

第 1 章

绪 论

人类对自己和生物体结构的认识，有着一段漫长的历史。开始人们只能凭借肉眼观察，但人眼分辨率在明视距离 250mm 时仅 0.2mm。后来人们学会使用放大镜进行观察。1665 年，英国物理学家虎克 (Robert Hooke) 用自己设计的光学显微镜第一次观察到细胞。自此，由于显微镜的分辨率达 250nm，使显微镜技术逐步在各学科中广泛应用，促进了细胞学、组织学、血液学、病理学和微生物学等学科的发展。1931 年，德国学者克诺尔 (Max Knoll) 和吕斯卡 (Ernst Ruska) 等人首先制成世界上第一台电子显微镜。由于电子显微镜 (下简称电镜) 的分辨率可达 0.15~0.20nm，从而对细胞形态的研究从显微结构跃至超微结构水平。人们借助显微镜和电子显微镜可进行组织、细胞、细胞器以及细胞内酶、蛋白质、DNA 分子、单个原子等进行定位定性观察，这些形态学方法信息直观，易为人们识别和理解，为生命科学和医学的发展起了极大的推动作用。

但随着现代生命科学和医学科学研究的发展，人们已意识到