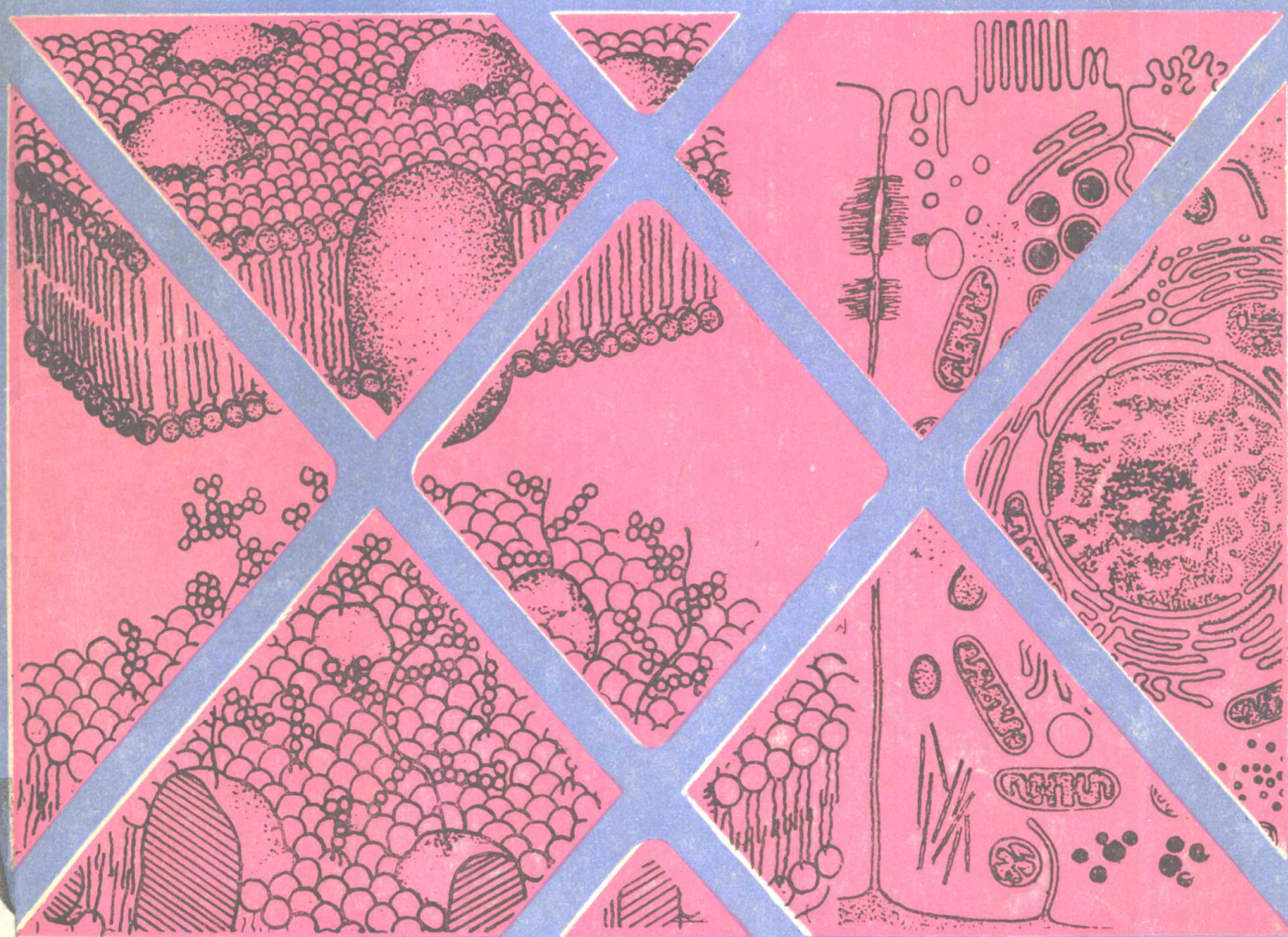


细胞生物学

鲁润龙 顾月华 编



中国科学技术大学出版社

123950

细胞生物学

鲁润龙 顾月华 编

中国科学技术大学出版社

1991·合肥

内 容 提 要

全书从分子水平描述细胞的结构和功能。全面地介绍了细胞生物学的基本内容和主要研究方法。着重阐明生物膜、骨架、细胞核染色体及其生命活动：代谢、增殖、通讯、免疫及其基因表达的调控。全书分为十四章。

本书反映了现代细胞生物学的概况和进展，可供综合大学、师范学院、农学院、医学院的教材和参考书。

细 胞 生 物 学

鲁润龙 顾月华 编

*

中国科学技术大学出版社出版

(安徽省合肥市金寨路 96 号，邮政编码：230026)

中国科学技术大学印刷厂印刷

安徽省新华书店发行

*

开本：787×1092/16 印张：25.75 字数：636 千

1992 年 3 月第一次印刷 1992 年 3 月第一版

印数：1—4000 册

ISBN7-312-00134-3/Q·1

[皖] 第 08 号 定价：6.65 元

前言

细胞生物学是一门以细胞为对象的研究生命活动现象、规律及其本质的科学。从研究细胞这个对象来看，它无疑是细胞学的发展；从细胞作为生命的实体、生命的基本单位，研究生命的特征、生命的活动规律及其本质，即从研究的内容所涉及的范畴来看，它又是更深层次的，即细胞水平的生物学。细胞生物学继承细胞学理论、遗传学理论、生物进化论，运用近代分子生物学的思想方法来研究细胞的各种生命活动，探索 and 解决生物学的基本问题，特别是遗传和发育问题。因此，细胞生物学是群体生物学、个体生物学、分子生物学的基础和桥梁。细胞生物学从细胞的不同层次，即细胞整体水平、亚显微结构水平、分子水平来研究细胞结构时空概念上的生命活动规律。这确实是分子生物学所不能替代的，也不是普通生物学所能完成的任务。然而，每一个学科，有它的研究领域，有它的特点，必然也有它的局限性。特别是研究生命的学科上，彼此在理论上、在研究方法上相互借鉴。也就是学科的相互渗透是有益的。近代分子生物学的发展，提供了许多研究方法和实验数据，开拓了新的见解，它推动着细胞生物学的发展，细胞作为生命最简单的实体结构，是由磷脂双分子层为基本成分的膜系和由微管、微丝、中等纤维等构成的细胞骨架所构建的生命实体的立体空间，而各种功能的蛋白质有序的分布在这个立体空间，进行物质和能量的代谢活动。而遗传物质 DNA，RNA，调节控制蛋白质的各种活动，以适应环境的变化，在生物进化的历史进程中，遗传物质 DNA，RNA，必须获得自我复制，自我组装和调节控制蛋白质的特性。在这极其简要的细胞轮廓的勾划中凝结着多少学科多少年的研究结晶。无疑，在今后的发展中，细胞生物学仍然和有关学科相互借鉴，完善和补充自己。细胞生物学承担着这个历史任务，在理论和方法的结合上更进一步。

在 1978 年到 1979 年的两年中，我国在老一辈科学家的带领下相继成立了细胞生物研究所，细胞生物学会，举办了各种有关的细胞生物学理论和实验方法的学习班，在高校相继开设了细胞生物学课程，培育了我国细胞生物学领域的教学和科研队伍。我们在上海中国科学院细胞生物研究所专家教授两年讲学的基础上，经过七八年的教学实践，参阅中外文献，学习兄弟院校的教学经验，整理出这本教材，献给我们的学生，也是给我们老一辈科学家的汇报。

全书因篇幅限制，分为十四章。第一章绪论简要阐明三个内容：细胞生物学研究对象和内容；细胞学的研究简史；细胞生物学研究方法。研究方法还贯串在各章节中和细胞工程这一章中。第二章细胞表面和细胞膜，第五章内膜系统，第六章核糖体，第七章细胞骨架。这四章构成了细胞的结构-动态的空间构形。包含着物质和能量信息传递机制，蛋白质合成和膜流系统。第三章、第四章着重介绍物质代谢过程中能量代谢活动。第八章细胞核，第九章染色体；第十章细胞繁殖。第十二章细胞分化，主要介绍遗传物质的形态、结构、功能，它在细胞各种生命活动中的调节控制作用。第十三章免疫，它既是生命的一个特点，又作为基因表达的调控实例。就目前所知，免疫细胞的生命活动和相互关系，及其基因是怎样进行调节控制其免疫活动的，积累了相当丰富的资料，是其他细胞类型所不及的，它大大丰富了细胞

生物学的内容。第十一章细胞通讯，无论作为细胞社会中一个成员，或者作为单个细胞，一切生命活动都在信息处理和传递过程中进行。信息一中断，生命活动就停止，因此，在细胞生物学中有这一章节是必要的。最后一章细胞工程，它作为研究方法的内容，又是细胞生物学的应用。有关细胞起源和进化问题分散在各个章节中介绍，未作专论。

我们想着力通过细胞这个生命结构基本单位，来展开生命活动的基本属性的探讨。但由于我们的知识局限性，才疏学浅，力所不能及。如何符合教学原则安排教学内容，可能也有许多不妥之处。请前辈和同行批评指正，欢迎同学们提出宝贵意见和建议，以便改进。

在这里，我们要特别感谢上海中国科学院细胞生物研究所的专家教授：庄孝德、姚鑫、曾弥白、潘玉芝、王幽兰、匡达人、顾国彦、陈汉源、张玉砚、叶敏、朱锦德等先生，他们曾不顾年迈体弱、路程疲劳，多次亲临指导、赐教。此外，指导实验的老师都为我们学校细胞生物学的教学贡献了力量。

最后，我们还感谢学校各有关单位的关心和支持，才使这本书问世！

我们希望读者喜欢它。

编 者

1989年7月1日

目 录

前言	(1)
第一章 绪论	(1)
第一节 细胞生物学的研究对象和内容	(1)
第二节 细胞学史概述	(3)
第三节 细胞生物学的研究方法	(6)
第二章 细胞表面和细胞膜	(19)
第一节 概述	(19)
第二节 细胞膜的物化性质	(19)
第三节 细胞膜的分子结构	(22)
第四节 细胞膜与物质运输	(28)
第五节 细胞膜信息传递与代谢调节	(37)
第六节 细胞膜与细胞识别	(43)
第七节 细胞连结	(51)
第八节 细胞表面的其它特化结构	(55)
第三章 线粒体	(56)
第一节 概述	(56)
第二节 线粒体的形态结构	(56)
第三节 线粒体的化学组成	(60)
第四节 线粒体的功能	(65)
第五节 线粒体遗传	(77)
第六节 线粒体的增殖和进化起源	(86)
第四章 叶绿体	(91)
第一节 叶绿体的形态结构	(91)
第二节 叶绿体的功能和光合作用	(96)
第三节 叶绿体 DNA 与半自主性	(99)
第四节 叶绿体的发生和起源	(101)
第五章 内膜系统	(105)
第一节 内质网	(105)
第二节 高尔基复合体	(112)
第三节 溶酶体	(124)
第四节 微体	(133)
第六章 核糖体	(137)
第一节 核糖体的结构和类型	(137)
第二节 核糖体的化学组成	(139)
第三节 核糖体的分离和重装配	(140)
第四节 核糖体的生物发生	(143)

第五节 核糖体的功能·····	(144)
第七章 细胞骨架·····	(147)
第一节 细胞骨架研究技术·····	(147)
第二节 微管·····	(148)
第三节 微丝·····	(159)
第四节 中等纤维·····	(170)
第五节 微梁网格系统·····	(176)
第六节 细胞核骨架·····	(177)
第八章 细胞核·····	(181)
第一节 概述·····	(181)
第二节 核膜·····	(182)
第三节 染色质·····	(186)
第四节 核 仁·····	(190)
第五节 核基质·····	(194)
第六节 环状片层·····	(195)
第七节 细胞核的起源·····	(197)
第九章 染色体·····	(199)
第一节 染色体的概况和研究历史·····	(199)
第二节 中期染色体的形态结构·····	(200)
第三节 染色体的数目和大小·····	(202)
第四节 异染色质和常染色质·····	(202)
第五节 染色体的结构·····	(204)
第六节 性染色体和常染色体·····	(210)
第七节 染色体结构和数目的变化·····	(212)
第八节 染色体的复制和修复·····	(214)
第九节 A 染色体和 B 染色体·····	(216)
第十节 人类染色体·····	(217)
第十一节 转录活跃的染色体·····	(220)
第十二节 原核细胞、病毒和中核细胞的染色体·····	(224)
第十三节 基因、重复基因和基因倍增·····	(226)
第十章 细胞繁殖·····	(229)
第一节 细胞周期·····	(229)
第二节 原核生物细胞周期·····	(231)
第三节 真核生物细胞周期·····	(232)
第四节 细胞周期的调控·····	(240)
第五节 细胞的衰老死亡·····	(243)
第六节 细胞癌变及其细胞周期·····	(246)
第七节 减数分裂·····	(249)
第十一章 细胞通讯·····	(259)

第一节	细胞间通讯的分子基础	(259)
第二节	受 体	(264)
第三节	cAMP 作为第二信使的作用方式	(274)
第四节	钙和钙调蛋白	(281)
第五节	甘油二脂和三磷酸肌醇	(289)
第六节	酪氨酸蛋白激酶系统	(295)
第七节	视觉激发分子	(297)
第八节	细胞通讯故障	(302)
第十二章	细胞分化	(308)
第一节	细胞分化和个体发育	(308)
第二节	原核生物的基因表达的调控	(313)
第三节	真核生物的基因表达的调控	(317)
第十三章	免疫	(339)
第一节	天然免疫	(339)
第二节	适应性免疫	(346)
第三节	淋巴因子的研究方法	(373)
第十四章	细胞工程	(378)
第一节	引言	(378)
第二节	基因工程	(379)
第三节	细胞杂交	(383)
第四节	细胞拆合技术	(385)
第五节	染色体工程	(387)
第六节	植物细胞遗传工程	(389)
参考文献		(399)

第一章 绪 论

第一节 细胞生物学的研究对象和内容

19 世纪是生物学蓬勃发展的奠基时期, 1838—1839 年施莱登 (Schleiden)、施旺 (Schwann) 的细胞学说的创立; 1858 年达尔文 (Darwin) 和华莱士 (Wallace) 提出, 并在 1859 年为达尔文证实的生物进化论; 1865 年孟德尔 (Mendel) 提出的, 于 1900 年重新被发现的遗传理论是近代生物学的三大基石。

20 世纪基因理论的发展, 特别是以分子遗传学为先导的分子生物学的发展, 它的新成就、新概念、新技术渗入到细胞学; 同时, 电子显微镜的应用和发展, 促进了亚显微形态结构的研究; 生物化学及其生化技术的应用, 促使细胞功能的深入研究。于是生物学一门新的分枝学科——细胞生物学诞生了。

细胞生物学的研究对象是细胞, 细胞组成有机体的结构和功能单位, 在单细胞生物中, 它就是整体。从这个意义上讲细胞生物学是细胞学的开拓和发展。

细胞生物学研究的内容是生命的结构和结构的生命活动及其规律。即细胞的形态结构和功能, 细胞的生长、发育、成熟、增殖、衰老死亡及其癌变, 细胞的分化及其调控机理, 细胞的遗传变异, 细胞的运动和通讯, 细胞的起源和进化。其核心是遗传和发育问题。从这个含义上讲, 它又是生物学研究更纵深的层次。所以细胞生物学是衔接分子生物学和普通生物学的桥梁和基础。

细胞生物学是一门运用分子生物学、近代物理、化学、数学的思想和方法来研究细胞的结构和功能、细胞的生活史及其各种生命活动的科学。从细胞整体水平、亚细胞水平、分子水平三个方面, 以动态的观点来考察研究细胞生命活动及其调控机制, 从而探索生命的本质和规律。它横向上连接着胚胎学、遗传学、生物化学、生理学。因此, 在科学发展道路上相互影响和促进, 它已成为生命科学中活跃的新学科。

细胞生物学的主要发展趋势和前沿领域。当前细胞生物学的主要发展趋势就是用分子生物学及物理化学数学方法, 深入研究真核细胞基因表达的调节和控制, 以期从根本上揭示遗传和发育的关系, 以及细胞生长、分化、衰老和癌变等基本的生物学问题, 而分子生物学的研究也离不开细胞的范畴及其内容。在遗传工程技术应用于高等生物中也携手合作, 创造成果。

从三届国际细胞生物学会议来看, 细胞生物学的前沿领域有以下几个方面:

1. 真核生物基因组的结构及其表达的调控

由于 DNA 重组技术和杂交瘤技术在真核细胞上的广泛应用, 以及 DNA 序列分析和氨基酸的顺序测定技术运用, 基因组的结构分析有了突破性进展。发现真核细胞结构基因是不连续的, 被内含子分隔成称之外显子的许多片段。基因表达时, 转录的 hnRNA 需经过“剪接”加工, 才能形成有功能的 mRNA 分子。基因组的结构不是静止不变的, 而是在发育过程中, 基

因和基因片段可能局部扩增或移位。移位因子可把特定性状的基因传递到后代中去。从癌基因的发现和基因重排导致抗体多样化的机理阐明,都说明基因重排在基因表达中的重要作用。

增强子的发现,进一步揭示真核细胞基因调控的复杂性。

总之,新方法和新发现正推动细胞生物学朝着分子水平揭示发育、遗传和进化的内在联系的方向,迅速地发展。

2. 染色质和染色体的结构

自从染色质的基本结构单位——核小体发现之后,染色质和染色体的结构研究越来越深入。因为在真核细胞中基因的表达受到染色质结构变化的调节。基因的激活只能在特定的染色质结构形式,即活性染色质中进行。而且构成核小体、染色质的组分磷酸化、乙酰化、甲基化都影响基因的转录活性。从染色体的不同水平来研究染色体的结构与功能是细胞生物学和分子生物学共同关心的十分重要的课题。

3. 生物膜和受体

细胞膜在物质运输、离子通透、能量转换、信息传递等方面起重要作用。而受体是细胞对激素、神经递质、生长因子等化学信号识别和起反应的关键分子。用单克隆抗体分离细胞膜受体,进而分离相应的基因将促进对更多受体分子结构的了解。受体接受信号后如何通过跨膜机制调节细胞生长和其他功能活动是一个正在深入探讨的问题。

在内膜系统中或线粒体、叶绿体膜上同样存在受体,生物合成的蛋白质有信号肽或导肽,它们在膜中定位起作用。这些研究正在深入。

4. 细胞骨架和核基质

细胞骨架包括微管、微丝、中等纤维、微梁系统,核基质也称核骨架。结构和功能的研究引人注目。细胞运动、形态建成和维持、物质运输、生长调节都与细胞骨架相关,特别是它与细胞表面的相互作用相关。核基质和细胞周期中染色体的包装和行为密切相关,也同时关系到基因的转录加工和传送。相当部分的细胞生物学家和分子生物学家把注意力转向基因产物如何构造成细胞结构的研究。

5. 细胞的生长、分化和癌变

细胞生长、分化、衰老或癌变是生物学家的难题。近年来发现反转录病毒癌基因和正常细胞的生长因子基因或生长因子受体基因在顺序上存在同源性,提出细胞癌基因的概念。细胞的生长、分化以及癌变,可能与这些基因正常活动或突变、重排有关。

6. 细胞社会学

生物体是由细胞构成的多层次的复杂系统。细胞社会学是从系统论观点出发,研究细胞群中细胞间的相互关系(包括细胞间识别、通讯、相互作用等),以及整体和细胞群对细胞的生长、分化等活动的调节控制。胚胎发育中的许多问题(如图式发生、胚层分化、形态发生、运动、组织分化和器官形成、再生等)都可从细胞群的特性、行为和相互作用等方面进行研究,这是一个从细胞生物学过渡到发育生物学的边缘领域。

7. 免疫

免疫是生物(特别是哺乳动物)重要的生理功能。免疫器官和免疫细胞的研究,特别是B、T淋巴细胞的结构和功能的研究相当深入,抗体多样性的原因已查明,基因重排导致抗体多样性其意义已远远超出免疫范畴。许多著名科学家转而研究T细胞受体基因、T细胞基因的表达及其调控,研究肿瘤免疫问题。研究免疫系统的发育和分化,各种生长激素、生长因子、

分化因子在淋巴细胞生长成熟分化中的作用及其调控。免疫和基因表达调控,和细胞通讯,几乎是同一课题的不同侧面,这将是本世纪末更加活跃的领域。

8. 细胞工程

细胞工程是指细胞水平的遗传操作,以及利用离体培养细胞的特性,生产特定的生物产品,或培育新的优良品种。目前已从细胞整体水平(细胞融合)、细胞器水平(核质移植和染色体倍性或组成)、基因水平(外源基因的导入)进行研究。

目前细胞工程发展迅速,在植物方面,原生质体培养已在水稻、小麦、玉米和大豆等作物突破,这为外源基因的导入打下基础。细胞融合也得到了一些杂种。目前国际上研究趋势是利用原生质体再生植株的实验系统进行外源基因的导入。相当多科学家研究植物细胞培养进行次生代谢物的分离和提取。然而这方面许多细胞生物学理论问题有待解决,许多技术问题有待突破。

在动物方面,突出的成就杂交瘤技术,有的已形成新的产业,有些还待方法学上的突破。如人—人B淋巴细胞杂交瘤,致敏淋巴细胞的体外转化为癌细胞等探索性研究。

合成含有特定遗传信息和能复制分裂的人工染色体用于高等生物遗传工程是国内外已受到高度重视,作为长期努力的目标。

总之,目前国内外细胞生物学的研究非常活跃,发展非常迅速。联合国科教文组织曾经选择细胞和大脑这两项课题作为生命科学中要特别注意发展的领域,足见其重要。

第二节 细胞学史概述

从胡克(Robert Hooke)发现细胞到今天已有三百二十多年的历史,期间经历了四个时期。

一、细胞学说的创立时期(1665—1875)

1. 细胞的发现

第一个发现细胞的荣誉应当归功于英国人胡克。他是一位物理学家和数学家,也是当时最好的机械师。1665年在伦敦皇家学会上他提出他用显微镜观察软木的研究结果,发现其中许多小室,状如蜂窝,称此“cell”。他曾计算在1/18英寸范围内有60个小室,因而进一步推算一立方英寸应该有10亿个小室。他在显微谱志中说,这可能是史无前例的发现。

而真正完整细胞的观察则经历了170年的时间,1674年,荷兰生物学家安东尼·范·列文虎克(Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723)能制成足够放大倍数的透镜,可进行初步的科学观察,发现池水中各种原生动物和单细胞藻类,1677年观察动物精子,1683年发现了细菌、鱼红血球。1675年马尔匹基(M. Malpighi, 1628—1712)发现在植物体的任何部分都是“cell”构成。直到19世纪30年代,人们开始注意到细胞内的结构。1831年罗伯特·布朗(Robert Brown)在兰科植物叶片表皮细胞中发现细胞核,1835年迪雅尔丹(E. Dujardin)根据在根足类的观察,发现细胞内的内含物称之“肉样质”(sarcodé),并认为这是生命的真正载体。1836年瓦朗丁(Valentin)在结缔组织细胞核内发现核仁。

道路虽然漫长,毕竟是人类对生物界从宏观过渡到微观认识的伟大一步。而作为生物学进展上如此重要的发现,又不能不归功于眼镜制造工业对光学科学的影响——显微镜的发明。

2. 细胞学说的建立

从细胞的发现到真正成为科学的理论是在19世纪30年代以后的事。植物学家施莱登

(M. J. Schleiden, 1804—1881) 在他的《关于植物发生》(On phyto-genesis, 1838) 一书中提出: “植物, 不论发展到多么高级, 都是由充分个体化的、各自独立的、分离的物体组成的聚合体, 这些物体就是细胞。” 和他同时的施旺 (T. Schwann, 1810—1882) 在他的影响下发表了《关于动植物在结构和生长中的相似性的显微研究》一文, 他观察到哺乳动物身体的基本成分, “至少有 99% 是由具有细胞核的细胞组成的”。施旺首次提出细胞学这个名称。并说 “细胞是有机体, 整个动物和植物乃是细胞的集合体, 它们依照一定的规律排列在动植物体内。”

细胞学说一经建立, 很快深入到各个领域中去, van Siebold (1845) 研究原生动物, 观察它是只含一个细胞的动物。Albert Kölliker (1841—1844) 把细胞理论运用到胚胎学, 证明精子和卵都是细胞, 卵通过细胞分裂发展成有机体。魏尔啸 (R. Virchow, 1858) 把细胞理论应用到病理学, 证明病理过程是在细胞和组织中进行。他提出一个著名结论 “一切细胞产自细胞” (omnis cellula e cellula)。1861 年, M. Schultze 给细胞下了如下定义: “细胞是赋有生命特征的一团原生质, 其中有一个核。”

细胞学说应该包含以下五点:

- (1) 生物都是由细胞和细胞的产物所组成;
- (2) 所有的细胞在结构和组成上是基本相似;
- (3) 生物体是通过其细胞的活动反映其功能;
- (4) 新细胞是由已存在的细胞分裂而来;
- (5) 生物疾病是因为它的细胞机能失常。

二、细胞学的经典时期 (1875—1900)

19 世纪的最后 25 年, 细胞学的研究得到了丰硕的成果, 习惯上称它为细胞学的经典时期。

1880 年施特拉斯布格 (Strasburger) 在植物细胞中发现核在细胞分裂时的变化, Bütschli 在原生动物、O. Hertwig 在海胆卵子受精时的观察几乎一致。1880—1882 年 Flemming 在蝶螈幼虫的组织细胞中观察细胞分裂, 称之为有丝分裂。Strasburger 进一步根据染色体的行为把有丝分裂分为前期、中期、后期、末期。

1875 年赫特维希 (O. Hertwig) 发现受精卵中两亲本核的合并, 1877 年施特拉斯布格在植物中发现同样受精现象。1883 年范·贝内登 (van Beneden) 在动物中和 1886 年施特拉斯布格在植物中发现了减数分裂现象。1898 年纳瓦兴 (Nawaschin) 和 1899 年吉格纳特 (Guignard) 先后发现了被子植物的双受精现象。

19 世纪的最后几年细胞学的研究注意力从细胞核转移到细胞质中, 贝内登和博韦里 (Boveri) 在 1883 年在动物和某些低等植物中发现中心体; 阿尔特曼 (Altmann) 在 1894 年、本达 (Benda) 在 1897 年在动植物细胞中发现线粒体; 高尔基 (Golgi) 在 1898 年发现了高尔基体。

在这短短的几年内, 获得如此丰硕的成果, 是由于这一时期人才辈出、技术革新。Böhm 首先使用苏木精 (1865), Corti (1851), Hartig (1854) 等使用洋红, 作为细胞染色的染料。Purkinje 授意他的学生设计出第一台切片机, Ernest Abbe (1878) 设计出一台复式显微镜, 具有消色差物镜、台下聚光器和台下照明。使细胞学家能看到放大倍数最高的最清楚的物体影象。

总之, 19 世纪把许多基础观察, 一些引人入胜的问题, 一套有用的技术和一些可作参考和富有指导意义的学说贡献给了 20 世纪。观察、技术和理论是科学研究进步的可靠保证。

三、实验细胞学时期 (1900—1953)

细胞学的研究从形态结构的观察深入到生理功能、生物化学、遗传发育机理的研究。在相邻学科的渗透下采用了实验的手段。借助 20 世纪先进技术力量,不仅使自己成长而且推动了各学科的发展。

1887 年赫特维希兄弟(O. Hertwig, R. Hertwig)用实验方法研究海胆卵的受精作用,R. Hertwig 1896, Leeb 1899, Morgan 1900 等用化学或物理方法刺激没有受精的卵也能发育,成为人工孤雌生殖。

Roux (1850—1924), 进行蛙卵实验,得出嵌合发育的学说,杜里舒(Driesch)进行海胆孵化实验得出调整发育的学说。Spemann 进行了细胞核在胚胎发育中的作用的实验。

这是细胞学和胚胎学相结合,虽然是初步的,毕竟是一个开端。

遗传学和细胞学相结合,是在 1900 年以后,孟德尔的《植物杂交实验》一文重新被发现。1901 年博韦里(T. Boveri)和萨顿(S. W. Sutton)提出了染色体理论。1910 年摩尔根(Morgan)以果蝇为材料,根据性染色体的分布解释了果蝇白眼突变遗传问题,提出基因直线排在染色体上。1915 年他和他的学生发表了《孟德尔遗传的原理》,1919 年出版《遗传的原理》,1926 年出版了《基因论》。摩尔根的学术思想在生物学的历史上有不可磨灭的功绩,他引导学术界弄清基因是什么,探索基因在分化发育中的作用。巴梯摩尔称他是分子生物学之父是当之无愧的。

细胞化学、细胞生理学、生化细胞学全面发展。

美国生物学家哈里森(Ross Harrison)用蛙淋巴液成功地培养神经细胞。

1910 年 Harrison 的合作者 Burrin 采用血浆首次培养温血动物的细胞。

1912 年 Carrel 制成 Carrel 瓶,采用严格的组织培养技术,成功地培养鸡胚胎成纤维细胞持续了三十四年之久(1912—1946)。

White (1946), Fisher (1948), Eagle (1957) 等人制成细胞培养基,使细胞代谢的研究突飞猛进。由于活细胞观察的需要推动了显微镜技术的应用,1953 年 F. Zernik (荷兰)因相差显微镜的发明获诺贝尔奖。

方法论的进展值得一提的是 Ruska 和 Knoll 发明电子显微镜对细胞学发展的作用。他们从 1928 年着手到 1938 年用于普通实验室,放大倍数 2 万倍分辨力为 $100\text{\AA}$ 。1949 年 Soverdlow 发明异丁烯酸定理,1952 年 Palade 使用锇酸固定,1953 年设计了超薄切片用的切片刀,同年 Sjöstrand 制成玻璃刀,并首次用电镜技术阐明了线粒体内部结构,这是一个划时代的进步。

为研究细胞器的功能,开拓了物理学和化学的细胞研究方法,细胞分部离心法和细胞化学方法相结合,其中克劳德(Cloude, 1943)的工作可为代表,他用快速离心机,将细胞匀浆后,线粒体分离出来,对此进行化学组成和功能研究;由此得出结论:线粒体是细胞氧化中心。这使生物化学和细胞学结合起来。

细胞化学和电镜技术的结合,具有特殊的意义,在电镜分辨力的水平下研究酶和其他生物大分子在细胞结构中的位置。用放射性同位素自显影方法在电镜中同样得到应用。

细胞化学领域中还有一个重要方面是在 1924 年 Feulgen 进行的工作,DNA 的特殊染色方法——Feulgen 反应。此法结合显微分光测定的方法,开始对细胞内物质进行定量分析。其后,Brachet (1940)用昂纳(Unna)染色液来测定细胞中的核糖核酸(RNA)。Caspersson (1936—1940)用紫外光显微分光光度法测定 DNA 在细胞中的含量。这些联系放射性自显影法、超微

量分析法,对细胞的核酸和蛋白质的代谢活动的研究起了很大促进作用。

四、分子生物学的兴起和细胞生物学的诞生

从宏观到微观的认识发展,按理说细胞生物学应该早一些诞生,而实际上是分子生物学绕开了繁杂的问题抓住了中心法则的核心内容抢先诞生了。恰恰是细胞生物学借鉴了分子生物的新成就新概念和新的思想方法,满月分娩。人们常常以1953年Watson和Crick等人提出DNA双螺旋分子结构模型为分子生物学诞生的里程碑,而细胞生物学从酝酿到成熟,常以1965年E. D. P. Derobetis将原著《普通细胞学》更名为《细胞生物学》到1976年在美国波士顿召开的第一届国际细胞生物学会议为标界,十多年的历史,它的发展是惊人的。

回顾分子生物学的历史,早在本世纪40年代,由于遗传学、微生物遗传学和生物化学的相互渗透,特别是第二次世界大战后,许多著名的物理学家、化学家转向生物学的研究,带动了一批年轻有为科学家,推动了生物学特别是分子生物学的发展。1941年Beadle和Tatum提出了一个基因一个酶的理论,1944年Avery等在微生物的转化实验中肯定了DNA是遗传物质,确定了遗传物质基础问题。1948年Boivin从测定生物生殖细胞和各种体细胞中DNA的含量,提出了DNA含量恒定理论。1953年,Watson和Crick等人用X射线衍射法得出的数据,提出了DNA双螺旋分子结构模型,解决了遗传的机制问题,奠定了分子生物学的基础。1956年Kornberg从大肠杆菌提取液中获得了DNA聚合酶,并以该菌的DNA单链片段为引物(primer),在离体条件下,第一个成功地合成DNA片段的互补链。1958年Meselson和Stahl用放射性同位素与梯度离心法分析了DNA的复制过程。证明DNA的复制是“半保留复制”。同年Crick又提出了遗传信息递传的“中心法则”。刚进入60年代,Nirenberg和Matthaei等通过对核糖核酸的研究,确定了每一种氨基酸的“密码”。遗传密码的揭露从分子水平证明生命的统一性。1961年Jacob和Monod提出了操纵子学说,阐明基因表达调控的机理。70年代,DNA重组技术和单克隆抗体杂交瘤技术的产生和发展,一方面,分子生物学越来越成熟,另一方面,分子生物学的新成就新概念、新技术渗入到细胞学。从分子水平、亚细胞水平和细胞整体水平来研究细胞的各种生命活动,如生长、发育、繁殖、遗传、变异、代谢、运动、免疫、起源和进化。于是生物学一门新的分枝学科——细胞生物学诞生了。

第三节 细胞生物学的研究方法

纵观细胞生物学发展的历史,我们可以体会到对细胞各种结构和功能及其生命活动的规律的研究与其研究思想方法和技术手段的发展休戚相关。所以,我们有必要概略综述一下研究方法,以便我们借鉴前人成功的经验和方法,来促进细胞生物学的发展。

一、各种显微镜技术

生物学史告诉我们:没有显微镜就没有细胞学。我们借助各种分辨力的显微镜观察细胞的内部结构。无论是细胞的发现,还是细胞内各种细胞器的发现,都离不开显微镜,今后的研究仍然是离不开它。它是细胞生物学的基本工具和手段。

各种显微镜技术和原理分别介绍如下:

1. 复式显微镜

现代实验室经常使用的光学显微镜都是由物镜、目镜和聚光器等组成的复式显微镜。其他种类的显微镜(如暗视野显微镜、相差显微镜等)也是在此基础上,根据光学原理适当改

制而成。

复式显微镜的基本结构都由光学系统和机械装置两大部分组成。光学系统包括物镜、目镜和照明装置。机械装置主要包括镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器和调焦装置等。

显微镜的主要性能,根据透镜成像的光学原理,其主要性能有分辨力、放大率、清晰度、焦点深度和镜像亮度等。

各种显微镜技术,最基本的一点是分辨力(resolving power)。人眼在 25cm 的明视距离处,能分辨被检物体细微结构最小的间隔的能力,称之为分辨力。人约为 100 微米,而显微镜的分辨力为 $R=0.61\lambda/NA$ ($NA=n\sin\theta$) R 为分辨力, NA 为镜口率 (n 为介质的折射率, $\sin\theta$ 为透镜视锥半顶角的正弦), λ 为波长。从公式分析,可见光最短波长为 3900 埃,即 0.39 微米,镜口率最大为 1.4,则 $R=0.61\times 0.39/1.4=0.17$ 。由此可见,人们可以从提高镜口率和利用短波来提高分辨力。镜口率中 n 为介质的折射率不会大于 1.6,如:空气的折射率为 1;水为 1.33;香柏油为 1.515,镜口角总是要小于 180° ,所以 $\sin\frac{\alpha}{2}$ 的最大值小于 1。所以对空气为介质的物镜,其镜口率一般为 0.05—0.95;而用香柏油的油镜头可接近 1.5,若用溴萘浸没可达 1.6。所以实际应用范围 1.4 左右。据此推算,显微镜的最小分辨力距离不会小于 $0.2\mu\text{m}$,也就是波长的 $1/2$ 。因此,要提高分辨力,只能从改变波长来解决。波长越短分辨力就越高。于是人们研制了紫外光显微镜、电子显微镜,见表 1.1。目前电子显微镜分辨力已达到 2 埃,比光学显微镜提高了 1000 倍。

表 1.1 各种光的波长比较

光的名称	波长 (nm)
可见光	760—390
紫外光	390—13
X 射线	13—0.05
γ 射线	1—0.005
电子束 100V	0.123
10000V	0.0122
100000V	0.00387

其次是放大率即放大倍数,显微镜总的放大倍数为目镜放大倍数和物镜放大倍数的乘积,这里所说的放大倍数是指长度而不是指面积和体积。此计算方法在标准镜筒长时才成立,即物镜的后焦点与目镜的前焦点之间的距离。公式如下:

$$K=K_1\times K_2=\frac{\Delta}{f_1}\times\frac{250}{f_2}$$

K ——总放大倍数

K_1 ——物镜放大倍数

K_2 ——目镜放大倍数

Δ ——光学镜筒长 (单位 mm)

f_2 ——目镜焦距 (单位 mm)

f_1 ——物镜焦距 (单位 mm)

250——明视距离 (单位 mm)

第三是焦点深度，当显微镜通过调焦到看清标本的某一点时，不仅是这一点物像，而且它的上下两侧也能看清楚，能看两侧的厚度叫焦点深度（焦深）。可用如下公式表示：

$$T = \frac{K \cdot n}{M \times NA}$$

K ——常数，约等于 0.24，

M ——显微镜的总放大倍数

n ——被检标本周围介质的折射率。

NA ——物镜的镜口率

从上式可知，焦深与总放大率和镜口率成反比。因此，高放大率和高镜口率的显微镜其焦深就浅，不能看到标本的全厚度。必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。见图 1.1。

2. 荧光显微镜

它是以紫外光线为光源，用以照射被检物体使之发出荧光，然后在显微镜下观察其形态及其所在位置的一种镜检术 (fluorescence microcopy)。利用这种显微镜可观察固定的切片标本，也可进行活体染色以后的活细胞观察。

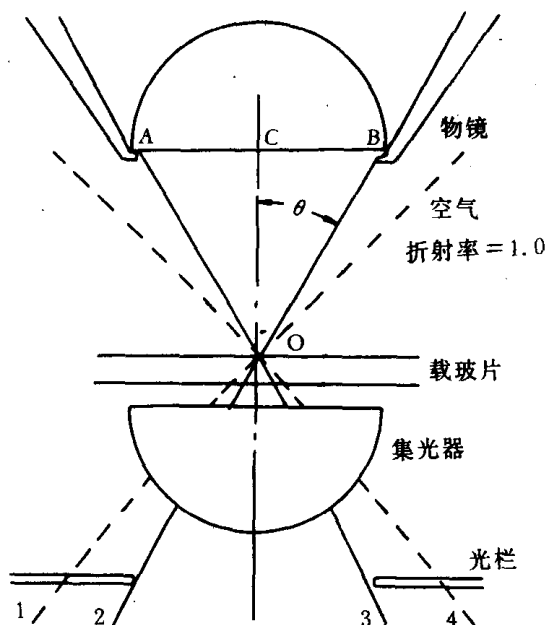


图 1.1 物镜的镜口角（即 AOB 角）

荧光显微镜的原理，首先，紫外线发生装置如弧光灯或水银灯作为强烈的紫外线发生光源。通过照明设备，把显微固定切片或活染的细胞透视出来，产生荧光。荧光是一种经紫外线照射后发出的可见光，此种荧光现象在实验中有两类：一类是细胞内含有的某些天然物质经紫外线照射就能发荧光，如植物细胞内叶绿体。另一类是人为的把荧光物质（荧光色素如吖啶橙、吖啶黄、刚果红等）加入细胞中，经活体染色或固定切片染色，经紫外线照射才产生荧光，这是诱发荧光。例如用吖啶橙染色，可使细胞内 RNA 发出红色荧光，DNA 发出绿色荧光。

第二，吸热装置如吸热水槽等，吸收弧光灯放出的很高的热量。

第三，滤光装置，在紫外线发生装置放出的紫外光线通路上安装一个滤光片，吸收其他各种波长光线，而只让紫外线通过，到达被检物体发出荧光。

在目镜前安装一个滤光片，就可成为眼睛保护装置，此滤光片只能通过荧光等可见光而不能透过紫外光。

目前，反射式荧光显微镜逐渐被落射式荧光显微镜代替，因为后者紫外线直接照到物体上，发出荧光，目镜所观察到的是荧光图象，不受紫外光干扰，同时也保护眼睛免受紫外线的干扰。

3. 电子显微镜

电镜和光学显微镜的成象原理基本一致，不同的是利用电子束和电磁场透镜 (如图 1.2)，我们曾在光学显微镜成像原理中介绍分辨力的极限是 $0.2\mu\text{m}$ 。因此，要提高分辨力，就要选择波长更短的光源，紫外光波长短可提高分辨力一倍，而电子束在不同的电压下有不同的短波长，目前电子显微镜已可分辨 $0.1-0.2\text{nm}$ 。我国已能制作 80 万倍、分辨力为 0.144nm 的电

子显微镜。

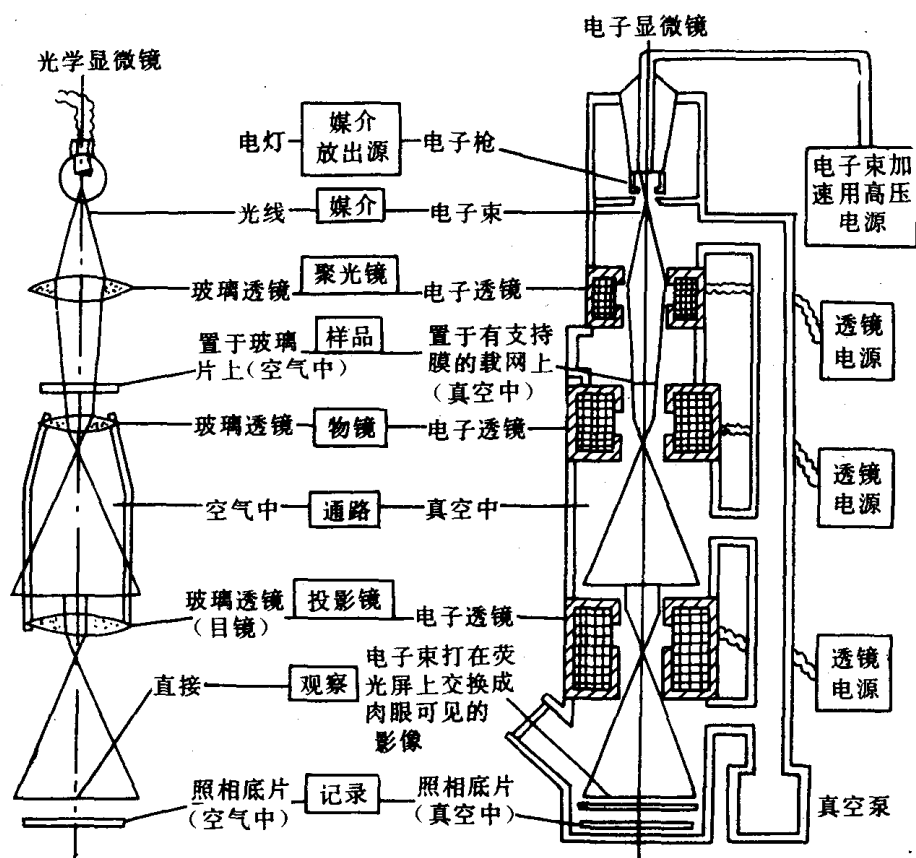


图 1.2 光学显微镜 (右) 与电子显微镜 (左) 比较图解

电子显微镜分为两大类：透射式电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)。前者是用来观察标本的内部结构，而后者是观察标本的表面形态结构。

电子显微镜观察标本与光镜不同，电镜观察标本一定要薄，厚度在 $0.05\mu\text{m}$ 内。而光学显微镜切片是 $5-7\mu\text{m}$ 左右。

标本的制作基本步骤是：

将组织块入固定液（如戊二醛）中固定



清洗后经丙酮或乙醇脱水（包括染色处理）



将组织块转入稀塑料包埋剂中渗透与聚合



将硬化的包埋块经修正，准备切片



用玻璃刀或钻石刀之超薄切片机切片，浮在水面上用铜网捞片



干燥后于电镜下观察