



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医等专业使用

案例版TM

医学细胞生物学

第2版

主 编 蔡绍京 霍正浩



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

案例版TM

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医等专业使用

医学细胞生物学

第2版

主 编	蔡绍京 霍正浩
副主 编	高殿帅 单长民 肖桂芝 侯 威
编 委	(以姓氏笔画为序)
	王尔孚 北华大学
	朱志强 沈阳医学院
	朱金玲 佳木斯大学
	杨 琳 大理学院
	肖桂芝 承德医学院
	沈 滢 河南科技大学
	陈小义 武警后勤学院
	陈立梅 北华大学
	武 辉 扬州大学
	单长民 滨州医学院
	侯 威 辽宁医学院
	聂晨霞 长治医学院
	夏米西努尔·伊力克 新疆医科大学
	高殿帅 徐州医学院
	蔡绍京 徐州医学院
	霍正浩 宁夏医科大学
	魏文科 湖北民族学院

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

郑 重 声 明

为顺应教育部教学改革潮流和改进现有的教学模式,适应目前高等医学院校的教育现状,提高医学教学质量,培养具有创新精神和创新能力的医学人才,科学出版社在充分调研的基础上,引进国外先进的教学模式,独创案例与教学内容相结合的编写形式,组织编写了国内首套引领医学教育发展趋势的案例版教材。案例教学在医学教育中,是培养高素质、创新型和实用型医学人才的有效途径。

案例版教材版权所有,其内容和引用案例的编写模式受法律保护,一切抄袭、模仿和盗版等侵权行为及不正当竞争行为,将被追究法律责任。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学:案例版 / 蔡绍京,霍正浩主编. —2版. —北京:科学出版社,2012.1

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-033083-3

I. 医… II. ①蔡… ②霍… III. 人体细胞学:细胞生物学-医学院校-教材 IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 269044 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:范璧合

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.sciencecp.com>

中国科学院印刷厂 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:850×1168 1/16

2012年1月第 二 版 印张:12

2012年1月第七次印刷 字数:413 000

定价:39.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第1版前言

细胞生物学是生命科学领域的前沿学科,也是医学的重要基础学科。在 21 世纪生命科学和医学快速发展的今天,为使医学生能够在有限的时间内掌握细胞生物学的基础理论和基础知识,同时也为适应五年制医学院校教学改革和教学实践,加强基础理论与医学实践联系的需求,我们尝试编写了这本案例版《医学细胞生物学》教材。

本教材共分 13 章,内容上注重细胞生物学的基础知识与基本技能,对近年来细胞生物学的热点问题及进展内容也有适量介绍。本教材注重实用性,能满足五年制医学院校各专业细胞生物学教学要求。

本教材由北华大学、徐州医学院、宁夏医学院、河南科技大学、新疆医科大学、滨州医学院、成都医学院、鄯阳医学院等 8 所院校 14 位教师编写完成。

在了解各院校教学实际的基础上,我们对与其他学科有较多重复的内容做了必要的删减。例如,在细胞核一章,将基因的转录、翻译及其调控的过程做了删减。这样更有利于把细胞生物学的最基本内容阐述清楚。

本教材的编写得到了河南科技大学医学院、宁夏医学院领导及生物学教研室全体同仁的支持、帮助,特此表示感谢。

编写案例版教材是一种新的尝试,受专业水平和编写能力的限制,加之时间仓促,难免存在错误或不当之处,望同行及使用本教材的师生给予批评指正,以便再版时修正、完善。

主 编

2007 年 6 月

第2版前言

细胞是生物体最基本的结构单位;细胞生物学是生命科学的重要分支学科,是研究细胞基本生命活动规律的科学,与医学科学密切相关。20世纪细胞生物学和分子生物学的发展,使医学研究深入到分子水平。医学细胞生物学的理论、技术和方法,在研究人体结构、功能和生命活动规律,探讨疾病发生发展机制中发挥着重要作用,在疾病诊断和治疗中也得到了越来越多的应用。因此,医学细胞生物学是基础医学和临床医学的重要基础。

《医学细胞生物学》(案例版)2007年出版,至今已4年。为反映生命科学的最新研究进展,适应医学教育发展的需要,在科学出版社指导下,2010年底,本书启动了第2版的修订工作。

2011年1月,在徐州医学院召开了第2版编委会议。与会者根据4年来的教学实践及师生的反馈意见,对第1版教材进行了分析、讨论,大家认为:第1版教材的框架及内容安排基本合理;案例的设置激发了学生的学习兴趣,对培养学生分析问题、解决问题能力和自学能力起到了促进作用。当然,教材也存在一些不足之处,如:内容稍显单薄,某些案例、视窗的设置不尽合理,插图质量有待提高等。为了保证编写工作的连续性及教材质量,第2版编写时,原则上,原参编单位编写任务不变,少数院校的编写内容作了调整。

2011年4月,各位编者完成初稿并发给其他编者审阅、征求意见;6月,在大理学院召开了审稿会,各位编者根据审稿会的意见又对书稿进行了认真修改;最后由主编统稿。

除增加“细胞工程”一章外,第2版基本保持了第1版的基本框架结构。与第1版相比,第2版显著改进的方面包括:①增加了近年来细胞生物学研究领域的最新研究进展,内容更充实,能满足学生毕业后执业医师资格考试及硕士研究生入学考试的需求。②案例设计紧扣内容的知识点,案例分析更具条理性和启发性;视窗的内容简明易懂,有助于拓宽学生的视野。③插图的数量增加,图的质量显著提高:除电镜照片外,全部插图均为彩图。④依据全国科学技术名词审定委员会公布的《细胞生物学名词》(第2版,2009),对名词(包括英文)及名词释义进行了修改。⑤语言、文字更加通顺、流畅,更具可读性。

参加第2版编写工作的院校,除第1版参加的北华大学、河南科技大学、新疆医科大学、滨州医学院、宁夏医科大学和徐州医学院6所院校外,还有新加入的沈阳医学院、辽宁医学院、长治医学院、承德医学院、武警后勤学院、湖北民族学院、大理学院、扬州大学及佳木斯大学9所院校。各位编者在教学、科研工作十分繁忙的情况下,为本书的编写牺牲了大量休息时间,对编写工作精益求精、一丝不苟、数易其稿,体现了对学生的高度负责的精神。

本书的编写得到徐州医学院和大理学院领导的支持和帮助,为编委会议和审稿会的召开做出了贡献,在此深表谢意;同时,还要感谢第1版主编王尔孚教授及没有参加第2版编写工作的第1版编者潘克俭、卫荣华、阮绪芝、张晓、周勇等,他们的辛勤努力为第2版的编写奠定了基础。

本书编写过程中,各位编者参阅了国内外众多作者的相关书籍和文献(附书末),并选用了部分插图,特向这些作者致谢。

虽然各位编者做出了很大努力,但由于专业水平及写作能力所限,书中难免存在缺点及错误,真诚期望同行专家、使用本教材院校的师生及其他读者提出批评意见,以便再版时修正。

蔡绍京 霍正浩
2011年10月

目 录

第一章 绪论	(1)	第六节 内膜系统与小泡运输	(84)
第一节 细胞与细胞生物学	(1)	第八章 线粒体	(86)
第二节 细胞生物学的发展	(1)	第一节 线粒体的形态结构和化学组成	(86)
第三节 细胞生物学与医学	(3)	第二节 细胞呼吸	(89)
第二章 细胞生物学研究方法	(6)	第三节 线粒体的半自主性	(92)
第一节 细胞形态结构的观察方法	(6)	第四节 线粒体的增殖与起源	(96)
第二节 细胞组分的分析方法	(10)	第九章 细胞骨架	(97)
第三节 细胞培养	(12)	第一节 微管	(97)
第三章 细胞概述	(14)	第二节 微丝	(102)
第一节 细胞是生命活动的基本单位	(14)	第三节 中间丝	(106)
第二节 细胞的化学组成	(14)	第十章 细胞核	(109)
第三节 细胞的形态、大小和数量	(23)	第一节 核被膜	(109)
第四节 原核细胞与真核细胞	(23)	第二节 染色质与染色体	(113)
第四章 质膜和细胞表面	(27)	第三节 核仁	(120)
第一节 质膜的化学成分	(27)	第四节 核骨架	(124)
第二节 质膜的分子结构	(31)	第五节 核遗传信息的储存和传递	(125)
第三节 质膜的特性	(33)	第十一章 细胞增殖和细胞周期	(131)
第四节 细胞表面及其特化结构	(35)	第一节 细胞分裂	(131)
第五节 质膜与细胞的物质运输	(36)	第二节 细胞周期	(136)
第五章 细胞通信和信号转导	(46)	第三节 细胞周期的调控	(138)
第一节 细胞通信和信号转导系统	(46)	第四节 细胞周期调控的遗传基础	(143)
第二节 信号转导的主要途径	(49)	第十二章 细胞分化	(145)
第三节 信号转导的共同特点	(53)	第一节 细胞分化的概念	(145)
第六章 细胞连接与细胞外基质	(55)	第二节 细胞分化的机制	(147)
第一节 细胞连接	(55)	第三节 细胞分化的影响因素	(149)
第二节 细胞外基质	(60)	第四节 干细胞	(150)
第七章 内膜系统和核糖体	(69)	第五节 细胞分化与肿瘤	(153)
第一节 核糖体	(69)	第十三章 细胞衰老与细胞凋亡	(156)
第二节 内质网	(72)	第一节 细胞衰老	(156)
第三节 高尔基体	(77)	第二节 细胞凋亡	(160)
第四节 溶酶体	(79)	第十四章 细胞工程	(168)
第五节 过氧化物酶体	(83)	第一节 细胞工程相关技术	(168)
参考文献	(175)	第二节 细胞工程的应用	(171)
索引	(176)		

第一章 绪 论

第一节 细胞与细胞生物学

自然界中存在着成千上万种千姿百态的生物,小至细菌,大到花草树木、鸟兽鱼虫,直至人类,用肉眼观察很难找出它们结构上的共同之处,但在显微镜下,它们的基本结构相同,都由细胞构成。细胞(cell)是生物体结构和功能的基本单位,要认识生物生命活动的规律,必须从“细胞”入手。

1665年,英国科学家 Robert Hooke 发现细胞,至今已有 300 多年的历史。在光学显微镜水平,研究细胞的化学组成、形态结构及功能的学科,称为细胞学(cytology)。随着科学的发展,人们对细胞的研究逐渐深入,已远远超出了光学显微镜可见的形态结构,也不再局限于对细胞功能变化的简单描述。传统的细胞学逐渐发展成为现代的细胞生物学(cell biology)。细胞生物学对细胞的研究,已从细胞的整体和显微水平深入到亚显微和分子水平,将多个层次有机结合,以动态观点考察细胞的结构和功能,探索细胞的基本生命活动,包括细胞的代谢、繁殖、生长、发育、遗传和变异、分化、运动以及衰老和死亡等生命现象。细胞生物学已不再孤立地研究某个细胞、细胞器、生物大分子或某个生命活动的现象,而是研究细胞的变化发展过程、细胞之间的相互关系以及细胞与环境之间的相互关系。简言之,细胞生物学是应用现代物理、化学技术和分子生物学方法,从细胞整体、显微、亚显微和分子等水平上研究细胞结构、功能及生命活动规律的学科。细胞生物学的研究内容包括:质膜、细胞质和细胞核的结构、功能及其相互关系,细胞总体和动态的功能活动(细胞生长、分裂、发育分化、遗传变异等)以及这些相互关系和功能活动的分子基础。

细胞生物学的兴起与分子生物学的发展密不可分,分子生物学(molecular biology)的研究成果对细胞生物学的发展有重大影响。近 50 多年来,分子生物学研究领域的重大进展,如 DNA 双螺旋结构模型的提出、基因序列分析、DNA 重组技术和酶分子活性基团的定位等都推动细胞生物学向更深层次迅速发展。细胞生物学介于分子生物学和个体生物学之间,与分子生物学和个体生物学相互衔接、相互渗透。因此,细胞生物学是一门承上启下的学科。细胞生物学与分子生物学一样,都是生命科学的重要支柱和核心学科,也是 21 世纪生命科学前沿活跃的具有良好发展前景和辐射力的学科。

医学细胞生物学(medical cell biology)是应用细胞生物学的理论和方法,研究人体细胞的形态结构与功能等生命活动规律和人类疾病发生、发展及其防治的科学。因此,本书在介绍细胞生物学基础知识的同时,还将讨论细胞病变与人类疾病发生的关系、疾病发生的细胞生物学基础,应用细胞生物学的方法,诊断、治疗疾病的前景等。

第二节 细胞生物学的发展

科学的发展依赖于研究技术的进步,细胞生物学的形成和发展与显微技术和实验技术的进步密不可分,其发展历程包括 5 个阶段。

一、细胞生物学的萌芽

细胞的发现与显微镜的发明是分不开的。1590 年,荷兰眼镜制造商 Z. Janssen 兄弟试制出第一台复式显微镜;1665 年,英国科学家 Robert Hooke 制造了第一台对科学研究有价值的显微镜,用其对软木及其他植物组织薄片观察时,发现了许多蜂窝状的小室,当时将这种小室称为 cell(小室之意,由拉丁文 cellulae 演变而来)。实际上,他所见到的仅仅是植物死细胞纤维质的细胞壁。

真正观察到活细胞的是荷兰科学家 Anton van Leeuwenhoek(图 1-1),他相继于 1673 年和 1677 年,使用能放大 300 倍的显微镜观察到了原生动物纤毛虫、细菌和哺乳动物的精子,1674 年观察到了鲑鱼红细胞及其细胞核。同一时期,意大利的 Malpighi 与英国的 Grew 注意到了植物细胞的细胞壁与细胞质的区别。



A. van Leeuwenhoek

图 1-1 细胞的发现者

视窗 1-1

自学成才的光辉典范——Leeuwenhoek

Leeuwenhoek(1632—1723)只上过中学,当过布商的学徒工,靠卖衣布和纽扣为生,直到1671年(39岁)才开始科学研究。他当初磨制透镜的目的是为了检测布匹的质量。他一生亲手磨制了550个透镜,组装了247架显微镜。据对他所磨制的至今仍收藏在荷兰乌德勒支博物馆的显微镜检测,其放大倍数为270倍、分辨率为 $2.7\mu\text{m}$;而根据他当初的记录分析判断,他使用过的显微镜的放大倍数应为500倍、分辨率为 $1.0\mu\text{m}$,这样高的水平,在当时是十分惊人的。

在40多年的科学生涯中,他观察了大量动植物的活细胞,看到了鲑鱼的细胞核,在牙垢中发现了细菌,并且对一些细胞的大小也进行了测量,他测得的红细胞直径 $7.2\mu\text{m}$ 、细菌直径 $3\mu\text{m}$,与现代测量的数值十分相近。因此, Leeuwenhoek作为细胞的发现者,当之无愧。鉴于在生物学上的卓越贡献, Leeuwenhoek于1680年当选为英国皇家学会外籍会员;1699年获得巴黎科学院通讯院士荣誉称号。Leeuwenhoek一生刻苦奋斗,孜孜以求,由一个布店学徒工成长为出类拔萃的学者,为后人树立了自学成才的光辉典范。

从显微镜发明到19世纪初的200多年中,由于显微技术未得到根本改进,故细胞的研究没有突破性进展,这一时期可以认为是细胞生物学的萌芽阶段。

二、细胞学说的建立

19世纪初到中叶,德国植物学家 M. J. Schleiden(1838)和动物学家 T. Schwann(1839),根据前人的研究成果,结合自己的工作,总结并提出了著名的“细胞学说”(cell theory),即“一切生物,从单细胞生物到高等动物和植物都是由细胞组成的;细胞是生物形态结构和功能活动的基本单位”(图1-2)。



M. J. Schleiden

T. Schwann

图 1-2 细胞学说的建立者

1858年,德国细胞病理学家 R. Virchow 提出“一切细胞只能来自原来的细胞”的观点,并把细胞理论应用于病理学研究,说明“机体的一切病理表现都基于细胞的损伤”,他的这些观点是对细胞学说的重要补充。

细胞学说的要点是:①所有生物体都是由细胞组成的,细胞是组成多细胞生物体的基本单位;②细胞是生物体结构与功能的单位;③细胞来源于已经存在的细胞,即由细胞分裂而来。

细胞学说阐明了生物界的统一性和共同起源,对生命科学的许多领域的研究和发展起到了积极的推动作用,奠定了现代生物学发展的重要基石。恩格斯高度评价细胞学说,将其与进化论、能量守恒定律共同列为19世纪自然科学的三大发现。

三、经典细胞学阶段

细胞学说的创立,有力推动了细胞的研究,并逐渐形成了一门新的学科——细胞学。19世纪中叶到20世纪初期,可以认为是经典细胞学阶段。这一时期,细胞学研究的主要成果是提出了原生质学说,发现了受精和细胞分裂现象,观察到了细胞中的一些细胞器等。

根据原生质学说(1861, Max Schultze; 1880, Hanstein),细胞是由质膜(plasma membrane)包围的一团原生质(protoplasm),包括细胞核内的核质(karyoplasm)和核外的细胞质(cytoplasm)。在细胞分裂研究中,先后发现了无丝分裂(amitosis)(1841, Re-mark)、有丝分裂(mitosis)(1880, W. Flemming)和减数分裂(meiosis)(1883, van Beneden; 1886, E. Strasburger)现象。在细胞质研究方面,随着显微镜分辨力的提高,石蜡切片方法、保存细胞结构的固定液和染色技术的应用,细胞内几种重要细胞器,即中心体(centrosome)、线粒体(mitochondrion)和高尔基体(Golgi body)等相继被发现,人们对细胞结构的认识达到了新的水平。

四、实验细胞学阶段

从20世纪初期到中叶,细胞的研究逐渐从形态学观察深入到对细胞化学成分、生理功能以及细胞与胚胎发育和遗传关系的研究,研究方法也从单纯使用显微镜发展到采用多种实验手段。因此,这一时期被称为实验细胞学时期。不同实验技术和方法的应用,以及与相邻学科的密切结合、相互渗透,促进了实验细胞学的分支学科相继形成。

1902年,Boveri和W. Sutton把染色体的行为同孟德尔的遗传因子联系起来,提出了“染色体遗传理论”;同年,W. Cannon认为遗传因子位于染色体上,

提出了“遗传的染色体学说”;1909年,W. Johannsen 把遗传因子改称为 gene(基因);1910年,T. Morgan 在大量实验工作的基础上,建立了“基因学说”。由此,细胞学和遗传学的结合形成了细胞遗传学(cytogenetics)。

1909年,R. Harrison 建立了组织培养技术,直接观察和分析细胞的形态和生理活动;1943年,A. Claude 应用高速离心法从活细胞中分离出细胞核和多种细胞器,如线粒体、叶绿体和微粒体(内质网的碎片),然后再进一步研究它们的生理功能、化学组成和各种酶类在细胞器中的定位等。这样,细胞学与生理学融合形成了细胞生理学(cytophysiology)。

1921年,R. Feulgen 首创测定细胞核内 DNA 的 Feulgen 染色法;1940年,J. Brachet 建立了应用甲基绿、派洛宁检测细胞中 RNA 的 Unna 染色技术;与此同时,Casperson 采用紫外显微分光光度法检测细胞中的 DNA 含量。这些对细胞内大分子的分布、定性及定量的实验研究称为细胞化学(cytochemistry)。

实验细胞学的进展极大丰富了细胞学内容,也为细胞生物学的形成奠定了基础。

五、细胞生物学的形成

受分辨率和放大倍数的限制,无法应用光学显微镜对细胞进行更深入的研究。20世纪30年代电子显微镜的诞生及20世纪50年代分子生物学的兴起,使细胞的研究深入到亚显微水平和分子水平。

自20世纪50年代开始,人们应用电子显微镜观察到了细胞的各种超微结构,包括质膜、内质网、叶绿体、高尔基体、溶酶体、线粒体、核糖体等;20世纪70年代的超高压电子显微镜的出现,使人们观察到了细胞质、细胞核中网状分布的细胞骨架;20世纪80年代扫描隧道显微镜和原子力显微镜的发明,使细胞的结构研究深入到大分子层次——可研究 DNA 和蛋白质等生物大分子的立体结构。

这一时期,在分子水平研究细胞的形态结构和生理功能,揭示细胞生命活动机制,取得了许多成就,形成了分子生物学。例如,1953年,J. Watson 和 F. Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型;1958年,M. Meselson 和 F. Stahl 提出遗传信息的流向是 DNA → RNA → 蛋白质;1955年,G. Grick 提出三联体密码假说;1961年,M. Nirenberg 和 Mathaei 根据核糖核酸实验确定了每一种氨基酸的“密码”。这些研究成果及后来建立的 DNA 重组技术(1968, P. Berg)、DNA 序列分析技术(1975, F. Sanger 和 W. Gilbert)和 PCR 技术(1986, K. Mulis 等)等分子生物学研究技术,不断渗透到细胞学各领域,使细胞的形态结构和功能研究深入到了分子水平。由此可见,从20世纪60年代开始,逐渐形成了从细胞整体、显微、亚显微

和分子等不同水平研究细胞结构、功能及生命活动规律的学科,即细胞生物学。

分子生物学以核酸和蛋白质为研究对象,细胞生物学以细胞为研究对象,细胞生物学与分子生物学有着内在的、不可分割的联系,两者之间相互渗透、相得益彰。分子水平的细胞生物学研究,聚焦于细胞生命活动与亚细胞成分生物分子变化的关系,是当代细胞生物学研究的重点,它将细胞生物学引向一个更高的阶段——分子细胞生物学(molecular cell biology)。分子细胞生物学的兴起是细胞生物学研究重点转移的反映,是现代细胞生物学的基本特征,是21世纪生物学的又一次革命。

第三节 细胞生物学与医学

细胞生物学与医学的关系十分密切。基础医学各学科,如组织学与胚胎学、病理学、微生物学、生理学、生物化学、分子生物学、遗传学、免疫学等,都要求从细胞水平阐明各自研究领域生命现象的机制,这些学科同细胞生物学相互渗透、相互交叉。生命科学的各分支学科的交叉汇合是21世纪生命科学的发展趋势,每一分支学科都要到细胞中探索生命现象的奥秘。例如,神经冲动的传导、肌肉收缩、活细胞内物质分子参与化学反应、药物与机体的作用等生理学、生物化学、药理学研究,均需以细胞生物学理论为基础。细胞生物学的新概念、新理论、新技术已渗透到医学研究的各个领域。

人体由细胞组成,细胞既是人体正常结构和功能的基本单位,也是疾病发生的基本单位;细胞正常结构和功能损伤,必然导致细胞结构的破坏和功能的紊乱,最终导致疾病,即细胞结构和功能的异常是疾病发生的根源和基础。正如1858年德国病理学家 Virchow 所说,“一切病理现象都来自细胞的损伤”。细胞生物学对细胞生命活动规律及细胞病理的研究成果极大地推动了医学的发展和进步。

细胞生物学在细胞分化、细胞凋亡、癌基因等方面的研究,使人们对疾病病因、病理、及发病机制有了全新的认识;以细胞生物学的原理、方法探索疾病的病因、诊断、治疗是医学研究的重要手段。

随着细胞生物学的发展,细胞化学、免疫组化、电镜技术、原位杂交、核型分析等新的细胞生物学技术,为疾病的诊断提供了新的手段。近年来,分子细胞生物学的研究进展为疾病治疗开辟了新的途径,有力推动了细胞治疗、基因治疗、肿瘤生物治疗及组织工程等一系列新的治疗方法的发展。

细胞生物学是现代医学的基础和支柱学科,是医学教育中一门重要的基础课程。作为医学生,学习细胞生物学的基本理论,掌握细胞生物学研究的基本技能,将为学习其他基础医学和临床医学课程打下坚实

的基础。现就细胞生物学与医学的关系,举例简述如下。

一、疾病发生的细胞学基础

(一) 细胞结构改变

质膜结构改变将影响细胞的功能。磷脂是质膜的重要成分之一,肺泡细胞质膜鞘磷脂和卵磷脂比值若超过正常范围,细胞就会凹陷和破裂,导致通气障碍。膜蛋白异常可导致膜转运载体蛋白病和膜受体病。例如,胱氨酸尿症是由于患者基因突变,引起肾小管上皮细胞质膜转运胱氨酸的载体蛋白功能下降或丧失所致。患者原尿中大量胱氨酸不被重吸收,可形成胱氨酸结石。家族性高胆固醇血症是由于患者 LDL 受体蛋白基因缺陷,导致质膜上 LDL 受体先天缺失或减少所致。

溶酶体与细胞吞噬物的消化分解有关,被称为“清道夫”。进入细胞的有害物质如不能被及时清除,可导致严重后果。肝细胞受肝炎病毒、酒精、四氯化碳等有害物质作用,可致内质网肿胀,镜下的肝脏病理切片上可见到典型气球样改变。

(二) 细胞分化异常

人体由 200 多种细胞组成,这些细胞的结构和功能差异是细胞分化的结果。细胞分化(cell differentiation)是指在个体发育过程中,由单个受精卵(未分化细胞)产生的细胞在形态结构、生化组成和功能等方面形成明显的稳定性差异的过程。

癌细胞来自高度分化的体细胞,主要特征之一是恶性生长和无休止分裂,其在性质上又转变为类似未分化的原始细胞,失去了专一性,这种现象称为细胞的去分化(dedifferentiation)。癌细胞不仅失去了原有细胞具有的正常功能,而且还获得了未分化细胞所没有的破坏能力;它失去了细胞间接触抑制的特性,不断分裂、四处扩散;在不受控制的分裂、生长过程中,夺取机体营养、释放毒素、侵袭正常组织,最终使机体消耗殆尽、枯竭而死。如果人们对正常细胞的分化和癌细胞的去分化机制有所了解,并能在分子水平上弄清其规律,就有可能找到使癌细胞逆转为正常分化细胞的方法。因此,细胞生长、分裂和分化的研究是与肿瘤防治密切相关的重要课题。

(三) 细胞凋亡异常

机体大量细胞在一定发育时期出现的正常死亡,称为程序性细胞死亡(programmed cell death),也称为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡异常是某些疾病的病因。在 T 细胞、B 细胞分化成熟过程中,由于免疫系统的选择作用,95% 的前 T 细胞、前 B 细胞均要死亡,并且成熟的淋巴细胞寿命也只有一天。这样,

细胞死一批,再生一批,相互交替,严格有序。若这种程序性细胞死亡过程异常,细胞只生不死,就会导致淋巴细胞堆积,形成白血病;该死的细胞不死,还将导致自身免疫病。

在肿瘤研究中,人们发现,肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞生长速度有关,而且也与肿瘤细胞死亡速度有关。研究表明,细胞凋亡异常是肿瘤发生发展的重要因素。哺乳动物的癌基因参与细胞凋亡的调控,原癌基因 c-myc 的过表达可致细胞凋亡,而原癌基因 bcl-2 的过表达,则可抑制 c-myc 诱导细胞凋亡的作用。抗癌基因 p53 在诱导细胞凋亡中也起重要作用。辐射或化疗引起淋巴细胞 DNA 损伤时,p53 基因产物 P53 蛋白大量增加,同时出现细胞凋亡;进一步分析发现,淋巴细胞 DNA 损伤引起细胞凋亡必需 P53 蛋白的存在,当 p53 基因失活或 P53 蛋白被其他癌基因产物抑制时,突变细胞得以继续存活,并发展为癌细胞。这说明 p53 基因产物诱导细胞凋亡可提供一种防御机制,使 DNA 损伤的突变细胞不能存活并演变为癌细胞。

二、细胞生物学与疾病的诊治

(一) 细胞工程

细胞工程(cell engineering)是运用细胞生物学、分子生物学的方法和工程学的原理,在细胞水平,按照人的需要,对细胞的遗传性状进行人为修饰,以获得有利用价值的细胞或细胞相关产品的综合技术体系。细胞工程技术在医学研究和实验中的应用日益广泛,在许多疾病的诊断和治疗中发挥着越来越重要的作用。

1. 单克隆抗体 运用 B 淋巴细胞杂交瘤技术制备的单克隆抗体,简称单抗(monoclonal antibody),在细胞工程中占有重要的地位。单抗主要用作体外诊断试剂,目前已研制出几百种体外诊断试剂盒。另外,单抗作为靶向药物的载体有广阔的应用前景。单抗具有与其对应抗原特异结合的特性,如果在载体分子上连接适当的治疗用药物(弹头),那么,这种结合型的单抗就有可能将治疗药物定向传递到药物作用的靶细胞,使治疗药物直接作用于病灶局部,发挥最大的治疗作用,同时避免该药物对其他组织器官的损害。这种药物与单抗偶联制成的“抗体——药物”结合物称为靶向抗肿瘤药物,也称为“生物导弹”。

2. 肿瘤疫苗 应用细胞生物学实验技术,通过病毒将动物的正常细胞和癌细胞融合,或将癌细胞的核移植到去核的卵细胞内,发育一段时间以减轻毒性;然后再将其制成肿瘤疫苗。研究表明,肿瘤疫苗注入患有肿瘤的动物体内,具有抑癌作用。目前,这项研究引起广大学者的普遍关注,有可能成为治疗人

类肿瘤的新途径。

3. 人工细胞 人工细胞是为避免生物体的排他性及对进入机体药物的破坏作用,利用质膜的结构特点制成的具有细胞功能的微囊。人工细胞对某些疾病可起到很好的治疗作用。例如,利用微囊包封过氧化氢酶治疗小鼠遗传性过氧化氢酶缺乏症;在微囊中封入大鼠胰岛细胞移植到大鼠腹腔,治疗大鼠糖尿病;含吸附剂和解毒剂的人工细胞作用于血液,用以治疗肝性脑病,这种人工细胞也称为人工肝。

4. 其他细胞产品 通过诱导突变或转基因方法定向改变细胞的遗传组成,使之获得新的遗传性状,再通过体外细胞培养,从而使细胞产生具有治疗作用的细胞产品。例如,由重组哺乳动物细胞规模化生产的医用蛋白“组织型纤溶酶原激活剂(tPA)”,作为溶血栓的药物,可用于脑卒中、心肌梗死等血栓疾病的溶栓治疗。

(二) 细胞治疗

细胞治疗(cell therapy)是将体外培养的具有正常功能的细胞植入患者体内,或直接导入病变部位,以代偿病变细胞所丧失的功能。干细胞是具有多分化潜能和自我复制功能的未分化细胞,胚胎干细胞具有分化为胚胎或成体的全部组织细胞的能力,成体干细胞可分化为一种或几种子代组织细胞。将干细胞分离并使它们向特定方向分化,就可以用健康的组织细胞取代患者体内病变的组织细胞。

帕金森病是大脑黑质多巴胺分泌神经元退化引起的疾病,神经干细胞具有被诱导分化为多巴胺神经元的潜能,将体外扩增的人神经干细胞移植至帕金森病模型大鼠,能在大鼠体内分化为成熟的多巴胺神经元,并可建立突触连接,可有效改善模型大鼠的帕金森病症状。

糖尿病是机体不能分泌或分泌不足或不能有效利用胰岛素所致。2001年,美国科学家在体外将小鼠胚胎干细胞诱导为可分泌胰岛素的细胞,将其注入糖尿病小鼠的脾脏内,24小时后发现,小鼠体内产生了胰岛素,血糖水平也恢复正常。以色列学者证明,人胚胎干细胞也可诱导为分泌胰岛素的细胞,为糖尿病干细胞移植提供了细胞源泉,此研究成果为糖尿病患者带来了根治疾病的希望。

另外,还可诱导干细胞分化为心肌细胞修复心脏,分化为软骨细胞修复关节;移植骨髓造血干细胞治疗白血病、再生障碍性贫血等。肿瘤放疗或化疗对造血系统的损伤,也可通过骨髓移植恢复造血功能。

(三) 组织工程

组织工程(tissue engineering)是通过体外构建组织器官,用于替代人体受损或缺失的组织器官的治疗方法。传统的组织工程是将组织特异的种子细胞种植在生物支架材料上,在体外培养构建组织器官。干细胞的多向分化潜能为组织工程提供了很好的种子细胞来源,特别是利用患者自身干细胞构建组织器官用于移植,可解决移植组织的免疫排斥问题。目前用上皮干细胞制备人工皮肤用作皮肤移植物、用骨髓间质干细胞等制备组织工程化骨和软骨用于修复组织缺损等已获得成功。

思 考 题

1. 细胞学与细胞生物学有何不同?
2. 细胞生物学与医学有何关系?医学生为何要学习细胞生物学?

(蔡绍京 杨 琳)

第二章 细胞生物学研究方法

动物细胞的直径大多为 $10\sim 20\mu\text{m}$ ，相当于人眼睛的分辨率的五分之一，况且细胞内还有精细复杂的内部结构和生理活动，所以，观察并研究细胞的形态、结构、组成及其功能活动必须借助仪器设备和相关的实验方法。细胞生物学的研究内容非常广泛，涉及的研究方法也很多，本章仅简要介绍常用的技术方法。

第一节 细胞形态结构的观察方法

分辨率(resolution)是指能清楚分辨物体细微

结构最小间隔的能力，即相邻两个物点间最小距离的能力。人眼睛的分辨率只有 0.2mm ，很难直接观察细胞及其精细、复杂的内部结构。显微镜的应用扩大了人们的视野，普通光学显微镜的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ，最大放大倍数为 1000 倍；电子显微镜的最大分辨率为 0.2nm ，放大倍数可达 150 万倍(图 2-1)。

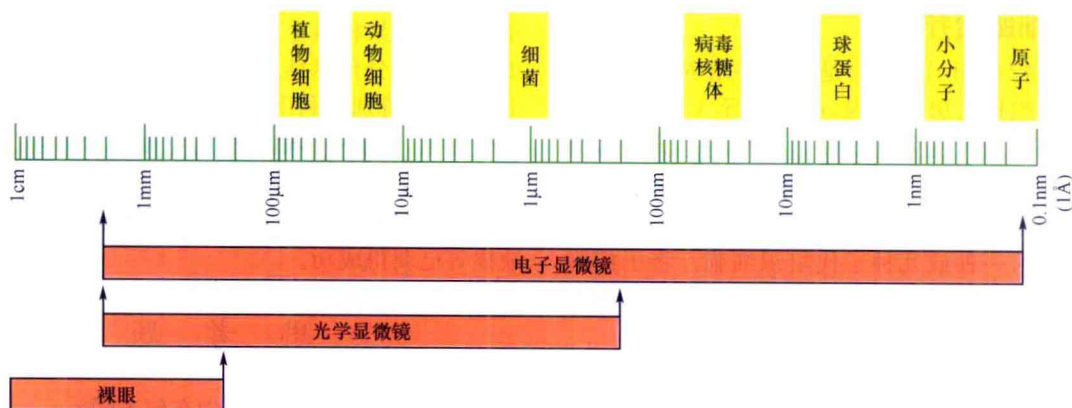


图 2-1 人眼睛和显微镜分辨率比较

一、显微结构的观察

显微结构(microscopic structure)是指在过光学显微镜所能观察到的细胞结构。光学显微镜(light microscope)是细胞生物学研究中最常用的工具，种类繁多，常用的有以下几种。

(一) 普通光学显微镜

普通光学显微镜由 3 部分构成，即：①照明系统，包括光源和聚光器；②光学放大系统，由两组玻璃透镜——物镜和目镜组成，是显微镜的主体；③机械系统，用于固定标本和照明、光学放大系统的准确调控。

显微镜下观察的物像是否清晰不仅取决于放大倍数，还与显微镜的分辨率有关。分辨率的大小取决于光的波长、镜口率和介质的折射率，用公式表示为：

$$R = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

其中， n 表示聚光镜和物镜之间介质的折射率，空气的 n 为 1，香柏油的 n 为 1.5； α 表示样品对物镜孔径的

半角； λ 表示照明光源的波长，可见光 λ 为 $0.5\mu\text{m}$ 。

一般来说，一定波长的光源不能用以探查比它本身波长短的结构细节，这是显微镜的基本限度。因此，光学显微镜的分辨限度(limit resolution)受可见光波长($0.4\sim 0.7\mu\text{m}$)的限制。细菌和线粒体的长径约 $0.5\mu\text{m}$ 大小，是光学显微镜能够观察到的最小结构。光镜能观察到的细胞结构有线粒体、中心体、高尔基体、核仁等。

(二) 相差显微镜

利用光的衍射和干涉现象，将透过标本的光线程度差或相位差转换成肉眼可分辨的振幅差的显微镜称为相差显微镜(phase contrast microscope)。相差显微镜能够将标本对光的衍射差异转变成明、暗差异，因此可看到普通光学显微镜难以观察的未经染色的标本及活细胞的形态结构。与普通显微镜相反，倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope)的光源和聚光器装在载物台下方，便于观察培养瓶中贴壁生长细胞的结构和活动；如再装配上影像设备，则可在镜下拍摄体外培养细胞的生长状态或功能活动，如细胞分裂、细胞迁移运动及细胞内部结构或组分在

细胞生命活动中的动态。

(三) 微分干涉相差显微镜

微分干涉相差显微镜(differential interference contrast microscope)所采用的光源是偏振光,能在很大程度上降低光噪声,相对于相差显微镜而言,其显微图像边缘没有光晕,分辨率较高,立体感强,有明显的浮雕感。因此,其图像质量明显高于相差显微镜,适合无色透明标本(如活细胞)的观察。

(四) 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark-field microscope)也可用于

观察活细胞等无色透明标本。与普通显微镜不同,暗视野显微镜使用特殊聚光器,其通光孔中央有一个圆形遮光板,能将照明光源的中央部挡住,使照明光线不能进入物镜和目镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,使被检物体在黑暗背景下呈现明亮图像。这种特殊照明方式使标本反差增大、分辨率提高,可观察到直径为4~200nm的颗粒,分辨率比普通光学显微镜高50倍。暗视野显微镜观察的是物体的轮廓,分辨不清内部的微细构造。图2-2显示的是同一细胞在4种光学显微镜下的图像。

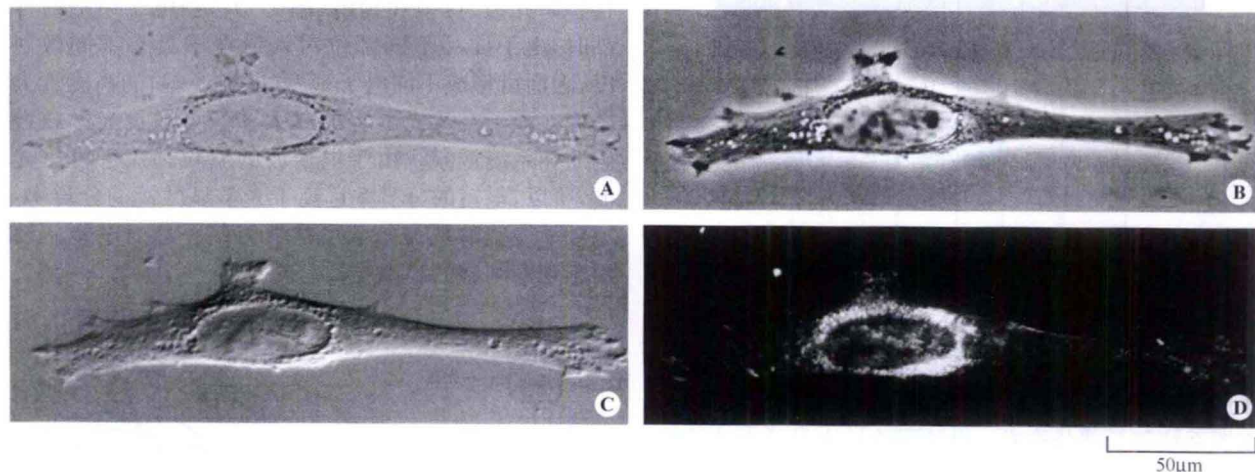


图 2-2 4 种光学显微镜下的同一细胞图像

A. 普通光学显微镜; B. 相差显微镜; C. 微分干涉相差显微镜; D. 暗视野显微镜

(五) 激光扫描共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)技术用激光作扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以激光扫描共聚焦显微镜分辨率较高,大约是普通光学显微镜的3倍。系统1次调焦,图像扫描限制在样品的1个平面;系统多次调焦,即可获得样品不同层次的图像,即断层扫描图像。这些图像信息都储于计算机内,通过计算机处理,可显示样品的三维立体结构。

激光扫描共聚焦显微镜广泛应用于细胞生物学、生理学、病理学、解剖学、胚胎学、免疫学和神经生物学等研究领域,可用于荧光定量测量、共焦图像分析、三维图像重建、活细胞动力学参数监测和胞间通讯研究等,是当今世界最先进的细胞生物学分析仪器。

(六) 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)是在光镜水平对特异性蛋白质等生物大分子定性、定位研究的最常用的工具之一,其基本结构包括光源装置、滤色

系统(包括激发光的滤光片和阻断滤光片)和光学系统。光源采用发光很强的高压汞灯,这种高压汞灯的光通过激发滤光片后,可以产生特定波长的激发光(如紫外光或蓝紫光);一定波长的激发光通过标本,可激发细胞内的荧光物质,使之发出一定颜色的可观察到的荧光;再通过物镜、目镜的放大及目镜中阻断滤光片对激发光过滤,便可在显微镜下观察到细胞中荧光的存在。

生物体内有些物质受激发光(如紫外线)照射后可直接发出荧光,如黄素单核苷酸(FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、木质素(绿色)、叶绿素(红色)等。有些物质本身不发荧光,但经荧光染料处理后,标本中对荧光染料有选择性吸收的部分受激发可发出次生荧光。常用的荧光染料包括:荧光素(免疫荧光的经典染料)、丫啶橙、罗丹明、伊红、德克萨斯红(Texas 红)、绿色荧光蛋白(GFP,用于蛋白质定性定位)、碘化丙啶(PI)、藻红蛋白(PE)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,用于显示细胞核和染色体)等。

近年来,随着分子生物学研究手段的不断发展,荧光显微技术在细胞内特定结构定位方面得到了广泛应用(图2-3)。

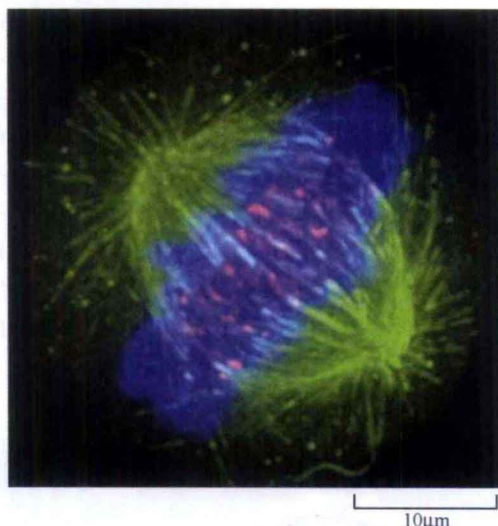


图 2-3 多荧光探针显微技术显示细胞分裂
绿色荧光抗体显示纺锤体微管;红色荧光抗体显示
着丝粒;蓝色荧光抗体显示染色体 DNA

二、超微结构的观察

1932 年,德国学者 Ruska 发明了第一台电子显微镜(electron microscope)。电子显微镜简称电镜,由电子照明系统、电磁透镜成像系统、真空系统、记录系统、电源系统等 5 部分构成。电镜用波长比可见光波长短 100 000 倍的电子束代替光波,大大提高了显微镜的分辨率。电镜观察到的结构称为超微结构(ultrastructure),也称为亚显微结构(submicroscopic structure),是超出光学显微镜分辨水平的细胞结构的统称。电子显微镜的发明和应用促进了细胞生物学的发展。

视窗 2-1

20 世纪的重大发明——电子显微镜

1928 年,德国电机工程师 Ernst Ruska (1906—1988) 开始研制电子显微镜,经过 4 年努力,世界上第一台电子显微镜在柏林工科大学高压实验室里诞生,但这台电子显微镜的放大倍数仅 12 倍。1934 年,Ruska 把电子显微镜分辨率提高到 50nm 后感到无能为力了。1935 年,Miller 等应用电子显微镜观察苍蝇的翅膀与腿,并拍出了照片,这激发了 Ruska 进一步研究的热情,Ruska 和 Borries 一起设计、改进研究方案,经过 3 年的努力,世界上第一台高分辨率电子显微镜终于在 1938 年诞生了。这台电子显微镜的分辨率达到 0.144~0.2nm,超出光学显微镜一千倍,这是一台真正的高分辨率电子显微镜。1986 年,Ruska 获得了诺贝尔物理学奖,他为人类探索微观世界做出了巨大贡献。

电子显微镜的发明与应用,为人类获得新型材料及促进现代医学的发展创造了条件,应用广

泛的纳米材料就是在电子显微镜应用基础上发展起来的,肝炎病毒也是通过电子显微镜观察到的。电子显微镜的发明与应用为 21 世纪科学技术的飞速发展奠定了基础。

(一) 透射电子显微镜

1. 基本原理 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)简称透射电镜。与光镜相比,透射电镜用电子枪发射的高速电子束(电子流)代替可见光,用特殊的电极或磁极(静电透镜和磁透镜)代替聚光镜、目镜和物镜(图 2-4)。当电子束透射样品时,由于样品不同部位对入射电子具有不同散射度,因而可形成不同电子密度(即浓淡差)的高度放大图像。显示在荧光屏上的放大图像可通过光学或数码照相系统记录。由于电子波的波长远短于可见光波,所以,电镜的分辨率远高于光学显微镜的分辨率,电子显微镜的放大倍数可达百万倍。透射电镜主要用于观察细胞的超微结构。

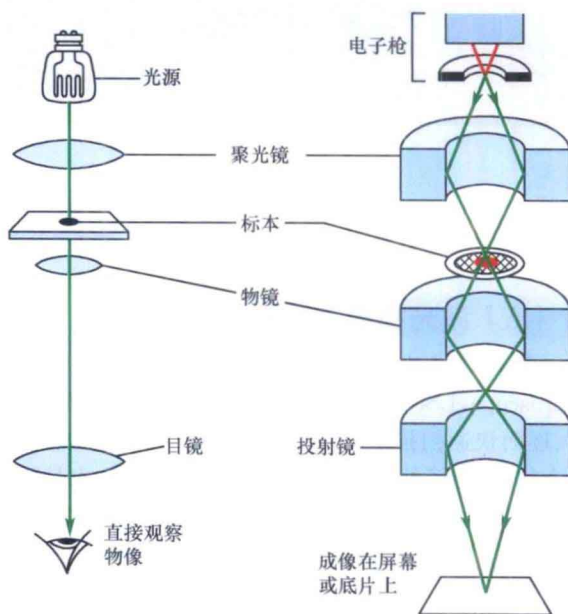


图 2-4 光学显微镜与电子显微镜的光路图比较

2. 样品制备

(1) 超薄切片技术:由于电子束的透射能力有限,因此,透射电镜要求样品的厚度为 50nm 左右,且能承受电子束的轰击,并使切片有足够的反差。这种厚度为 50nm 左右的切片称为超薄切片(ultrathin section),超薄切片是透射电镜对样品的最基本要求。

制作超薄切片,通常先用锇酸和戊二醛双重固定样品,以保持所观察样品的真实性;然后用丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,以保持所观察样品有良好的支撑;再用热膨胀或螺旋推进的方式切片,以控制切片的厚度;最后用重金属(铀、铅)盐染色,制成的标本形

成明暗反差。

(2) 负染色技术:负染色(negative staining)技术是利用高密度重金属物质在透射电镜下不显示结构的特性,用重金属盐(如磷钨酸钠)对铺展在载网上的样品染色;样品经干燥后,整个载网都铺上了一层重金属盐;有凸出颗粒的地方没有染料沉积,在图像中背景是黑暗的,而未被包埋的样品颗粒则透明光亮,从而衬托出样品的精细结构,出现负染效果。因此,负染色技术是染背景、不染样品的染色方法。

负染色技术可使分辨率提高到 1.5nm 左右。某些微小生物标本、细胞内生物大分子组成的结构,如病毒、线粒体基粒、核糖体和蛋白质组成的纤维等,可通过负染色电镜技术观察其精细结构,还可以从不同角度观察其三维结构。

(3) 冷冻断裂蚀刻复型技术:冷冻断裂蚀刻复型(freeze fracture etching replication)技术的基本方法是:先将生物样品在液氮(-196°C)中快速冷冻,防止形成冰晶;然后将冷冻的样品迅速转移到冷冻装置中,并迅速抽成真空;在真空条件下,用冰刀横切冷冻样品,使样品的内层被分开、露出两个表面。因此,冷冻断裂蚀刻复型技术可显示断面的精细结构(图 2-5)。例如,用冰刀可将质膜切成 P 面(protoplasmic face)和 E 面(exoplasmic face),在 P 面和 E 面上可清晰观察到膜蛋白质(图 4-18)。

(4) 冷冻蚀刻(freeze etching)技术:冷冻蚀刻技术是在冷冻断裂技术基础上发展起来的、更复杂的复型技术,其基本方法是:将冷冻断裂的质膜样品的温度稍微升高,让样品中的冰在真空中升华,则质膜表面显示出浮雕样结构;对浮雕表面进行铂-碳复型,并在腐蚀性溶液中除去生物材料;复型经重蒸水多次清洗后,捞在铜网上即可进行电镜观察。

(二) 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)简称扫描电镜,是应用电子束在样品表面扫描、激发二次电子成像的电子显微镜。与透射电子显微镜成像方式完全不同,扫描电镜成像在荧光屏上,主要用来观察标本的表面结构。

扫描电镜的分辨率不及透射电镜,一般在 3nm 左右,但所形成图像的立体感很强(图 2-6),而且样品制备简单,不需做超薄切片。一般样品只需经固定、脱水、干燥,在其表面喷镀一层金属膜后(镀膜可增加二次电子,以产生鲜明的影像)即可进行观察。扫描电镜用于观察标本表面精细的三维形态结构。此外,在电子束的轰击下,样品中的不同原子还会发出具有特定波长的 X 线,若在扫描电镜的基础上,增加 1 个能谱仪,收集发射的 X 线信号,就可对样品各个微区的元素成分进行分析。

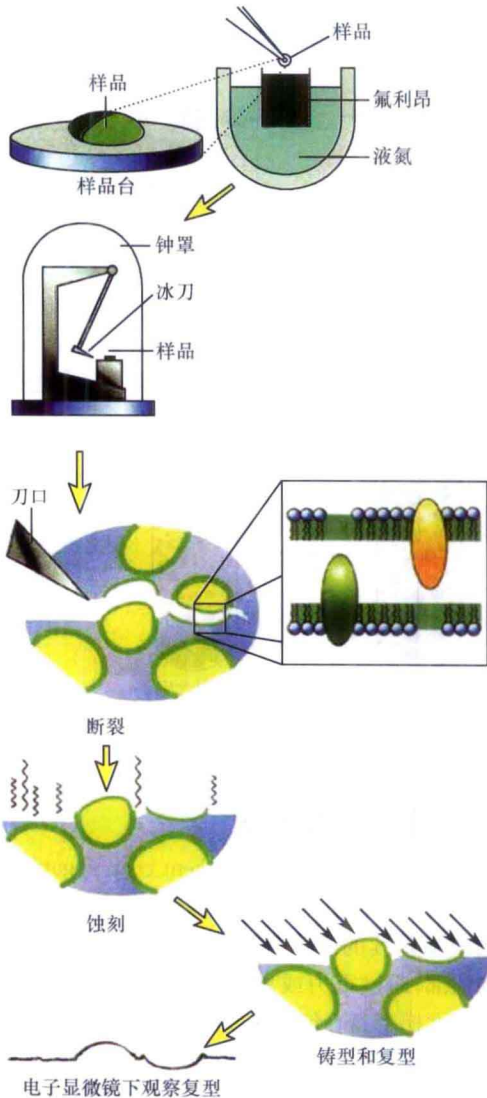


图 2-5 冷冻断裂蚀刻复型技术

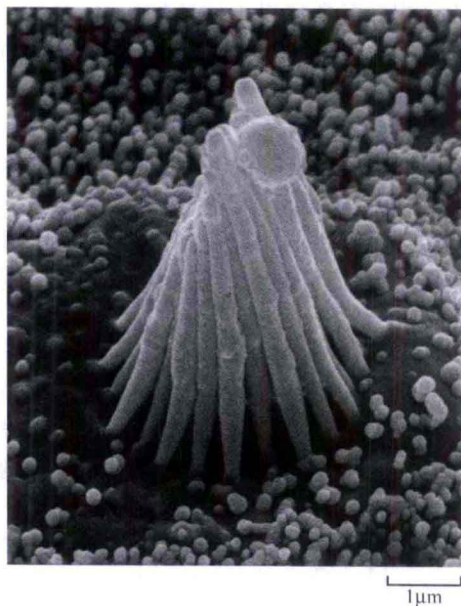


图 2-6 牛蛙内耳绒毛细胞突出的纤毛(扫描电子显微镜)

第二节 细胞组分的分析方法

一、离心技术

离心(centrifugation)是分离细胞器及各种大分子的基本手段。通常将离心速度在 $18\,000\sim 35\,000\text{r/min}$ 、离心力在 $60\,000\sim 100\,000\times g$ 的离心方法称为高速离心(high speed centrifugation),离心力在 $100\,000\times g$ 以上的离心称为超速离心(ultracentrifugation)。分离的目的不同,所用的离心方法也不同,差速离心和密度梯度离心是常用的两种离心方法。

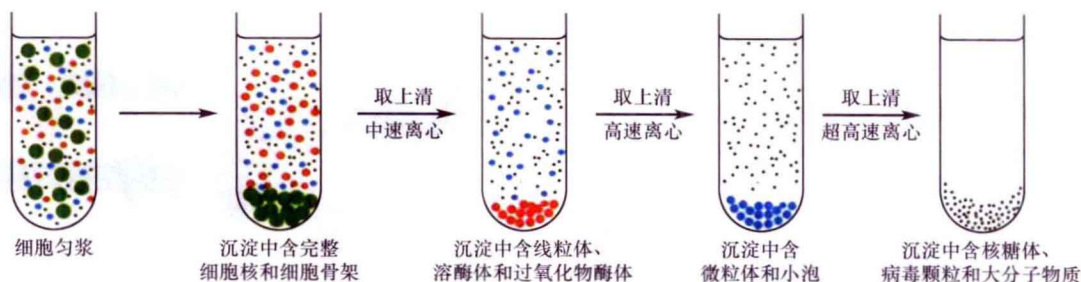


图 2-7 差速离心进行细胞组分分离

(二) 密度梯度离心

密度梯度离心(density gradient centrifugation)是用一定的介质(氯化铯,蔗糖和多聚蔗糖)在离心管内形成连续或不连续的密度梯度,将细胞悬液或匀浆置于介质的顶部,通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离。密度梯度离心包括速度沉降和等密度离心两种。

1. 速度沉降 速度沉降(velocity sedimentation)采用介质的最大密度小于被分离生物颗粒的最小密度,生物颗粒或细胞、细胞器在平缓的密度梯度介质中,按各自的沉降系数以不同速度沉降,从而达到分离的目的。速度沉降主要用于分离密度相近而大小不等的细胞或细胞器。

2. 等密度离心 等密度离心(isodensity centrifugation)是细胞或细胞器在连续梯度的介质中经足够大离心力和足够长时间,沉降或漂浮到与自身密度相等的介质处,并停留在那里达到平衡,从而将不同密度的细胞或细胞器分离。等密度沉降适用于分离密度不等的颗粒。

等密度沉降要求在较高密度的介质中进行,介质的最高密度应大于被分离组分的最大密度,而且介质的梯度变化不能太平缓;再者,等密度沉降的离心力场要求比速率沉降法大 $10\sim 100$ 倍,故往往需要高速或超速离心,离心时间也较长。然而,离心力大、离心时间长都对细胞不利,大细胞比小细胞更易受高离心力的损伤,而且停留在等密度介质中的细胞比处在移动中的细胞受到更大的损伤。因此,等密度沉降方法只适于分离细胞器,不适于分离和纯化细胞。

(一) 差速离心

通过不断增加相对离心力,使密度均一介质中大小、形状不同的颗粒由低速到高速逐级分离的方法称为差速离心(differential centrifugation)。差速离心可用于分离大小悬殊的细胞,但更多应用于分离细胞结构组分,是分离细胞核和细胞器的常用方法。各种细胞器的沉降顺序依次为:细胞核、线粒体、溶酶体与过氧化物酶体、内质网与高尔基体、核糖体。差速离心可将细胞器初步分离(图 2-7),如需进一步分离纯化,则需应用密度梯度离心方法。

视窗 2-2

密度梯度离心实验证实 DNA 半保留复制

DNA 半保留复制是 1957 年哈佛大学教授 Meselson 和他的学生 Stahl 通过氯化铯密度梯度离心实验证实的。氯化铯密度梯度离心技术,可将质量差异微小的分子分开,在离心管内形成连续的 CsCl 浓度梯度。离心管底部溶液的密度最大,顶部最小。经过离心,溶于 CsCl 溶液的 DNA 分子集中在一条狭窄的带上,DNA 分子与该处 CsCl 密度相等。

Meselson 和 Stahl 采用稳定的同位素 ^{15}N 作 DNA 标记,使 DNA 分子密度显著增加,从而可通过密度梯度离心将 DNA 亲代链和子代链区分开来。先将大肠埃希菌(*E. coli*)在含有 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 作为唯一氮源的培养液上培养若干代,使合成的 DNA 的 N 原子全部被 ^{15}N 标记;提取 DNA 进行 CsCl 梯度离心。然后,将生长在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 培养液的 *E. coli* 转移到以密度较低的 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 作为唯一氮源的培养液中培养,分别提取增殖 1 代和增殖 2 代的 DNA 进行密度梯度离心。

结果表明,N 原子全部被 ^{15}N 标记的 DNA 离心时,只出现位于离心管底部的一条带;在 ^{14}N 氮源培养液中培养 1 代提取的 DNA,密度梯度离心后,也出现 1 条带,但位于 ^{15}N 标记 DNA 带的上面;培养 2 代提取的 DNA 离心后,出现两条带,第一条带位置与培养 1 代的 DNA 带相同,第二条带位于第一条带上面,说明第二条带的 DNA 密度更轻。

