



<http://www.cella.cn>

第二章 细胞生物学实验技术



METHODS AND TECHNIQUES



本章内容提要

- 第一节 显微技术
 - 一、光学显微镜
 - 二、电子显微镜
 - 三、显微操作技术
- 第二节 生物化学与分子生物学技术
- 第三节 细胞分离技术
- 第四节 细胞培养与细胞杂交





<http://www.cella.cn>

第一节 显微技术

光学显微镜与电子显微镜





<http://www.cella.cn>

一、光学显微镜



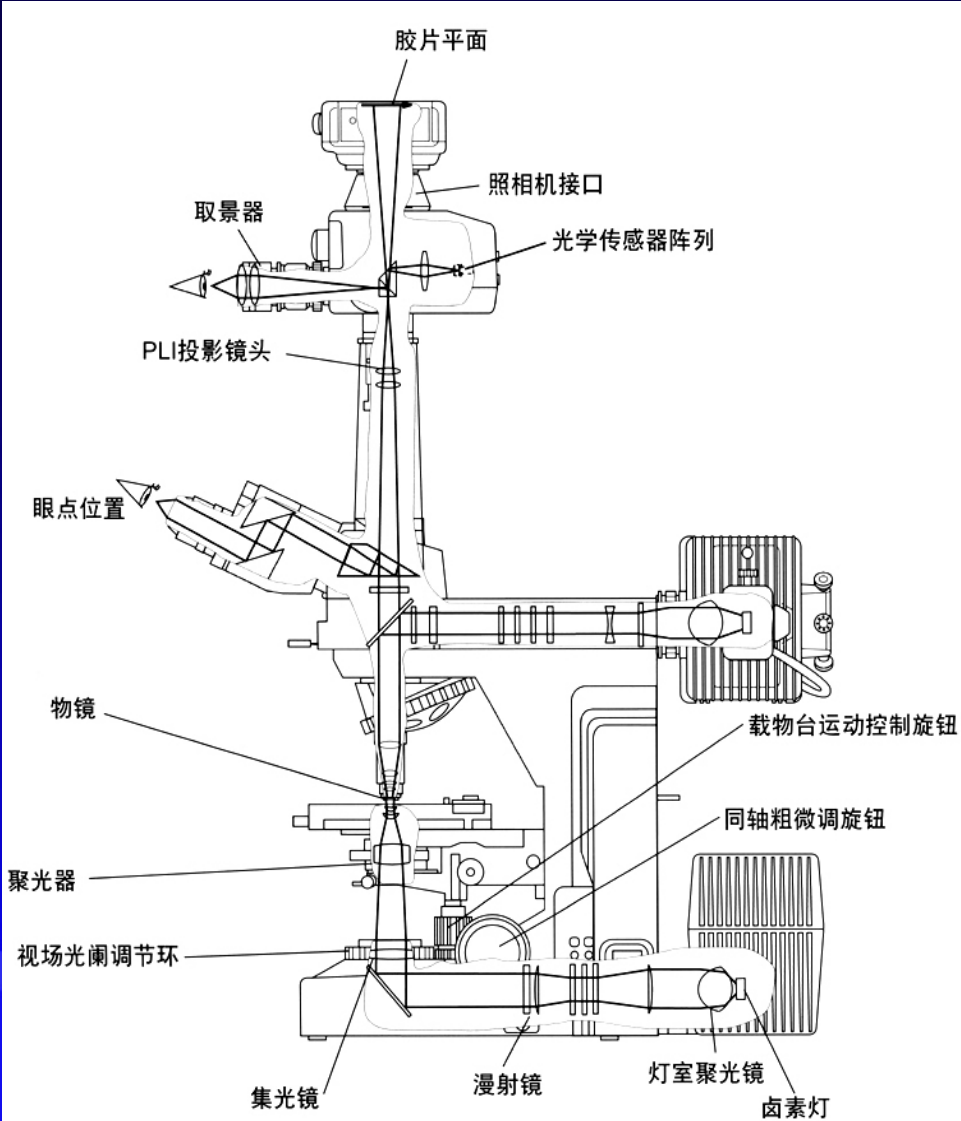
Dr Tian 2008

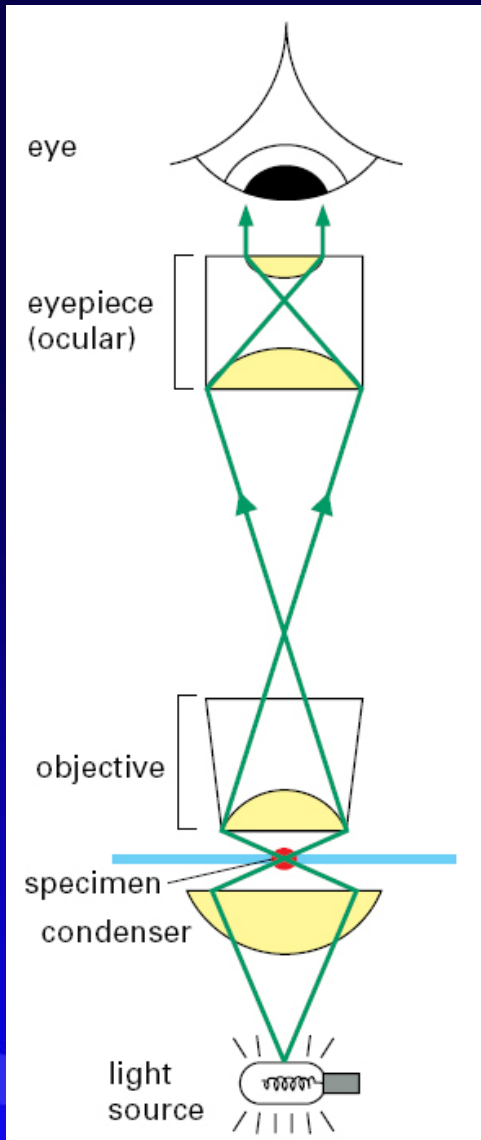
(一) 普通光学显微镜

- 1. 构成：
 - ①照明系统
 - ②光学放大系统
 - ③机械装置
- 2. 原理：经物镜形成倒立实像，经目镜放大成虚像。



Structure of Microscope





Light Pathway of Microscope

- 3. 分辨力：指分辨物体最小间隔的能力。
- 光学显微镜的分辨力 $R=0.61\lambda/N.A.$
 - 其中 λ 为入射光线波长；
 - $N.A.$ 为镜口率 $= n \sin\alpha/2$ ；
 - n =介质折射率；
 - α =镜口角（样品对物镜镜口的张角）。



表一、几种介质的折射率

| | | | | |
|-----|----|------|-------|-------------|
| 介质 | 空气 | 水 | 香柏油 | α 溴萘 |
| 折射率 | 1 | 1.33 | 1.515 | 1.66 |



- 显微镜的几个光学特点：

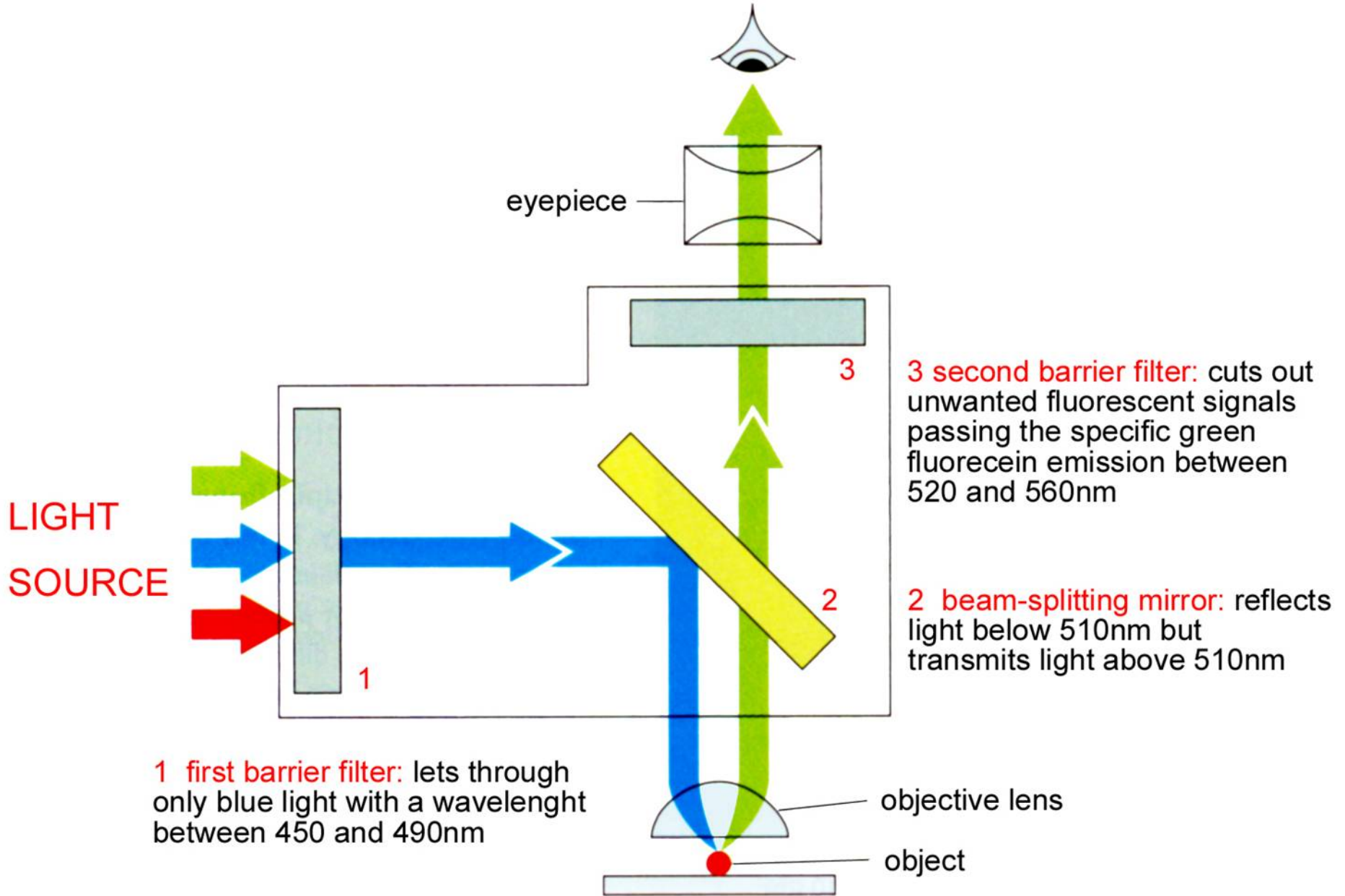
- 介质折射率越接近镜头玻璃的（1.7）越好；
- $\sin \alpha / 2$ 的最大值小于1；镜口率最大约1.6；
- 普通光线的波长为400~700nm，光镜分辨力约为0.2 μm ，人眼的分辨力为0.2mm，因此显微镜的最大有效倍数为1000X。



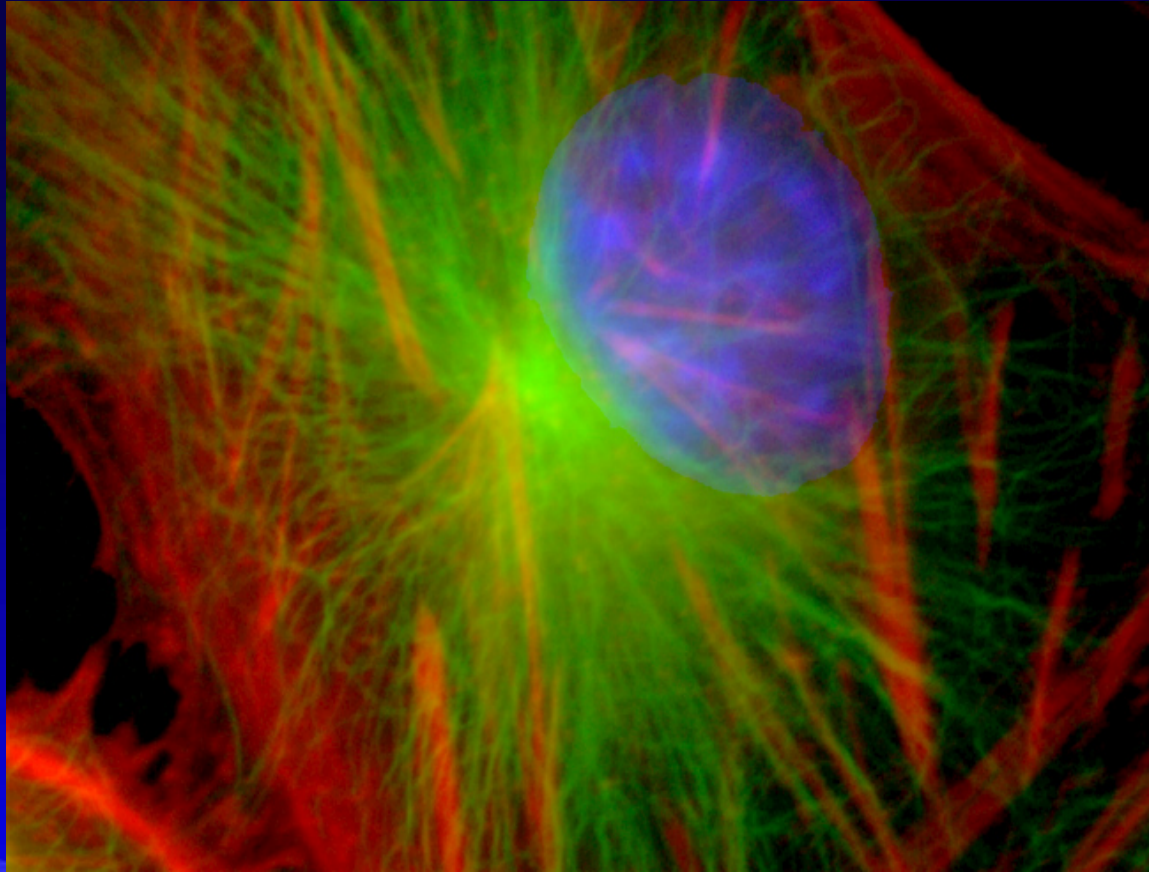
(二) 荧光显微镜 Fluorescence microscope

- 特点：光源为短波光；
- 有两个特殊的滤光片；
- 照明方式通常为落射式。





- 用于观察能激发出荧光的结构。用途：免疫荧光观察、基因定位、疾病诊断。



Fluorescence image, DNA in blue and Microtubules in green



（三）激光共聚焦扫描显微境

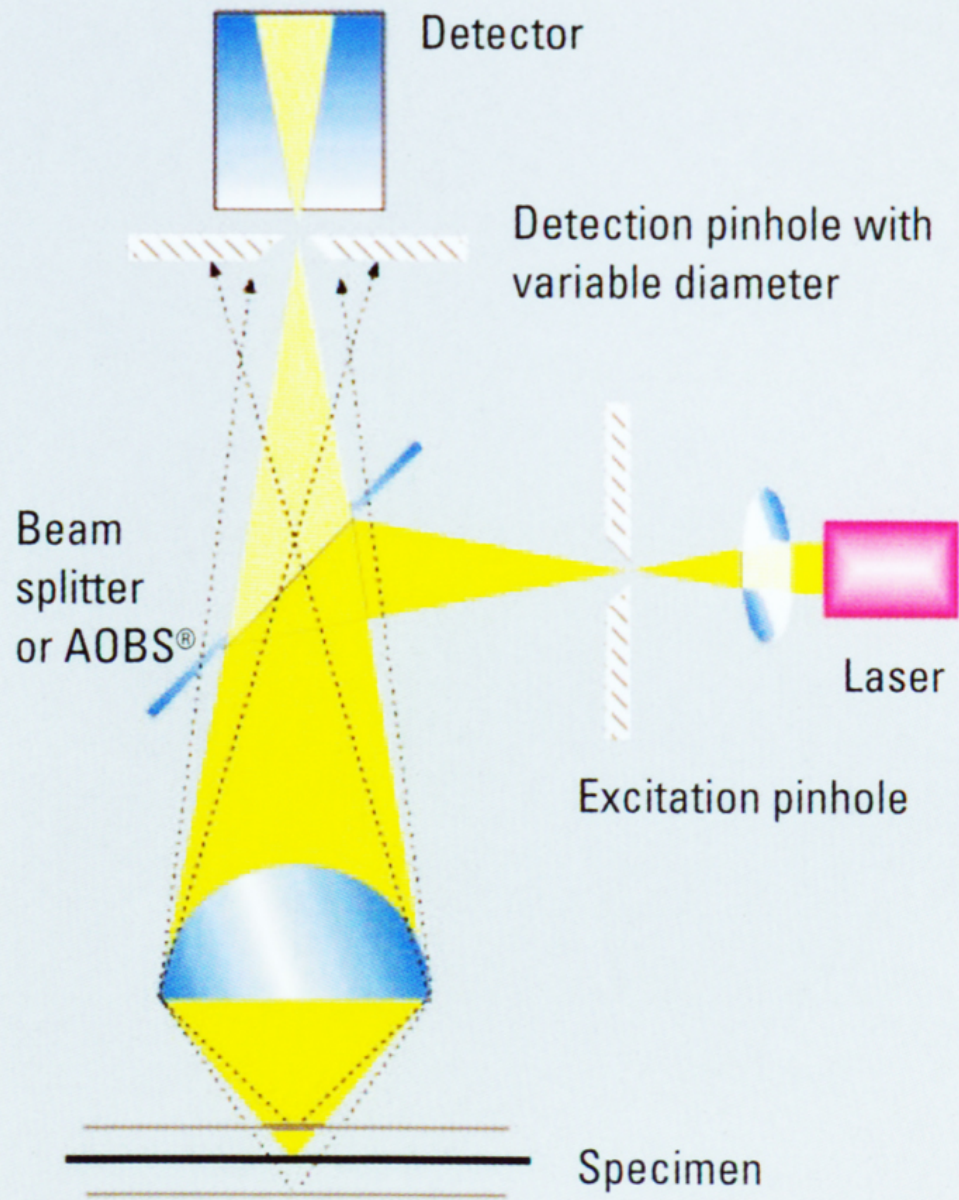
Laser confocal scanning microscope, LCSM

- 用激光作光源，逐点、逐行、逐面快速扫描；
- 能显示细胞样品的立体结构；
- 分辨力是普通光学显微镜的3倍；
- 用途类似荧光显微镜，但能扫描不同层次，形成立体图像。

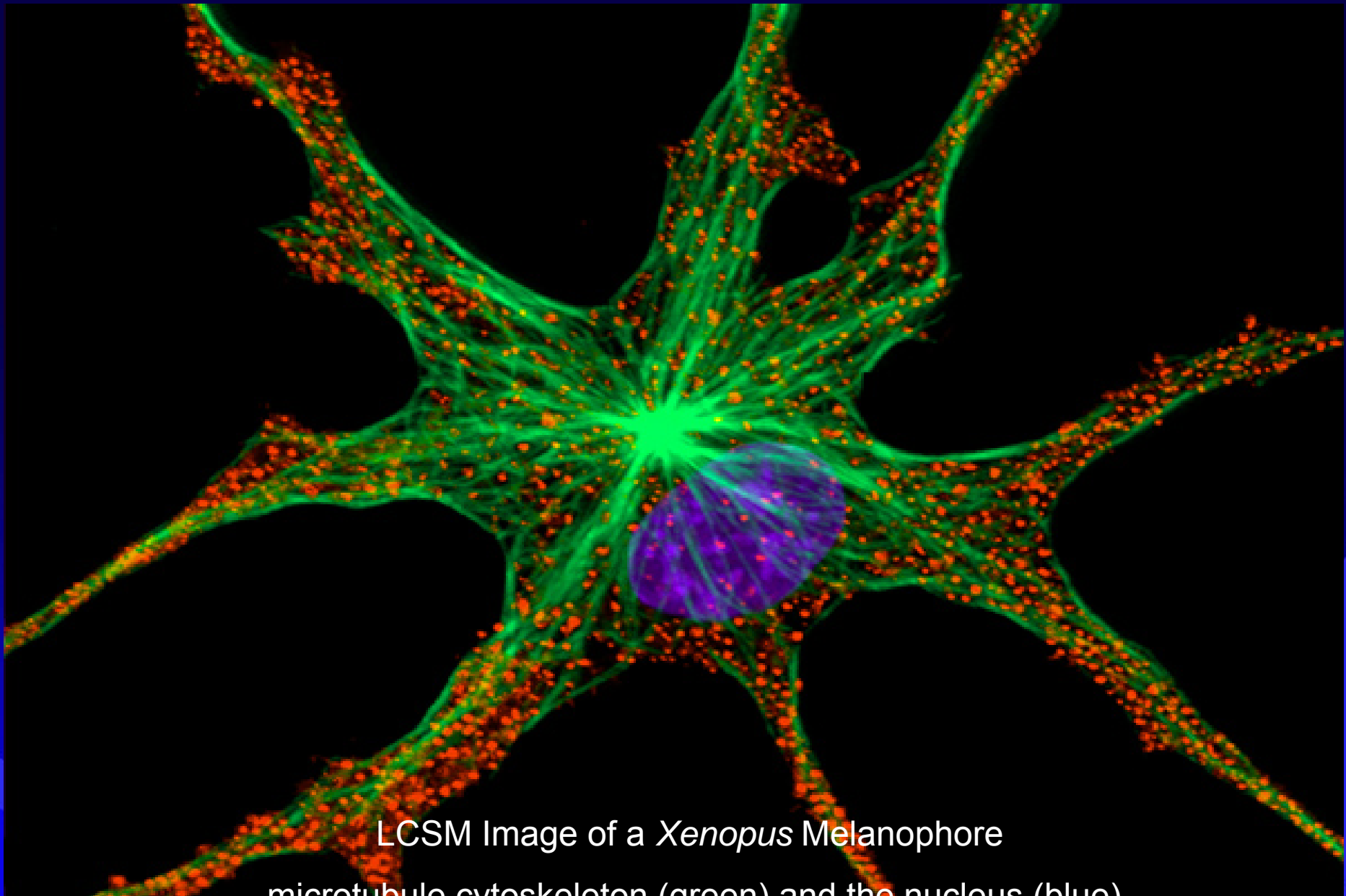


laser confocal scanning microscope, LCSM





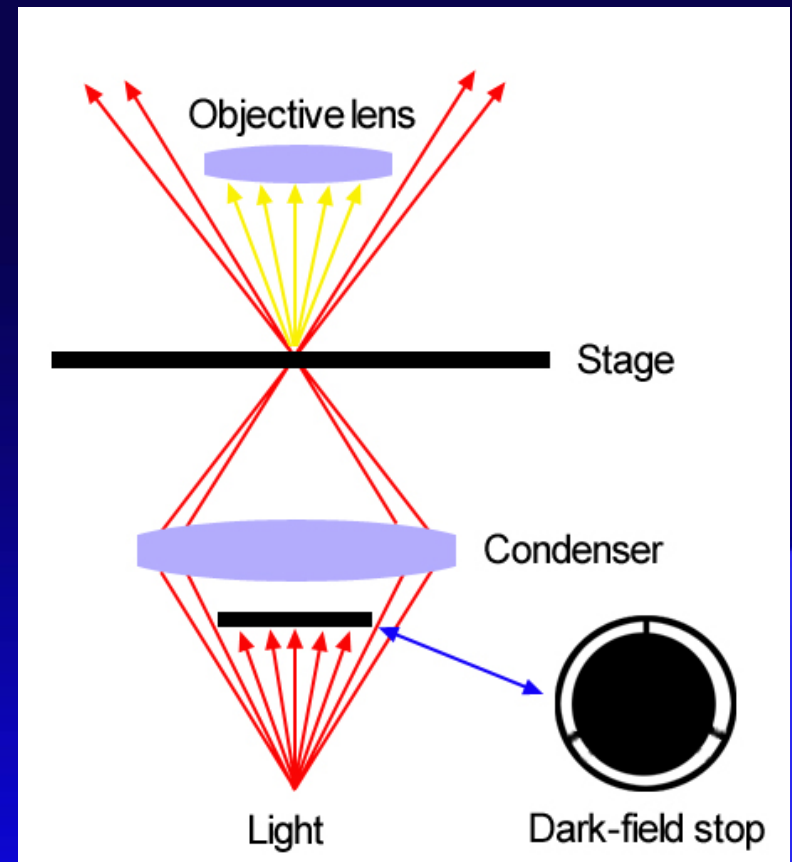
激光共聚焦扫描
显微镜光路图



LCSM Image of a *Xenopus* Melanophore
microtubule cytoskeleton (green) and the nucleus (blue)
<http://www.itg.uiuc.edu/>

(四) 暗视野显微镜 dark field microscope

- 聚光镜中央有挡光片，视野背景是黑的，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，物体边缘是亮的。
- 可观察 4~200nm 的微粒子，分辨率比普通显微镜高50倍。

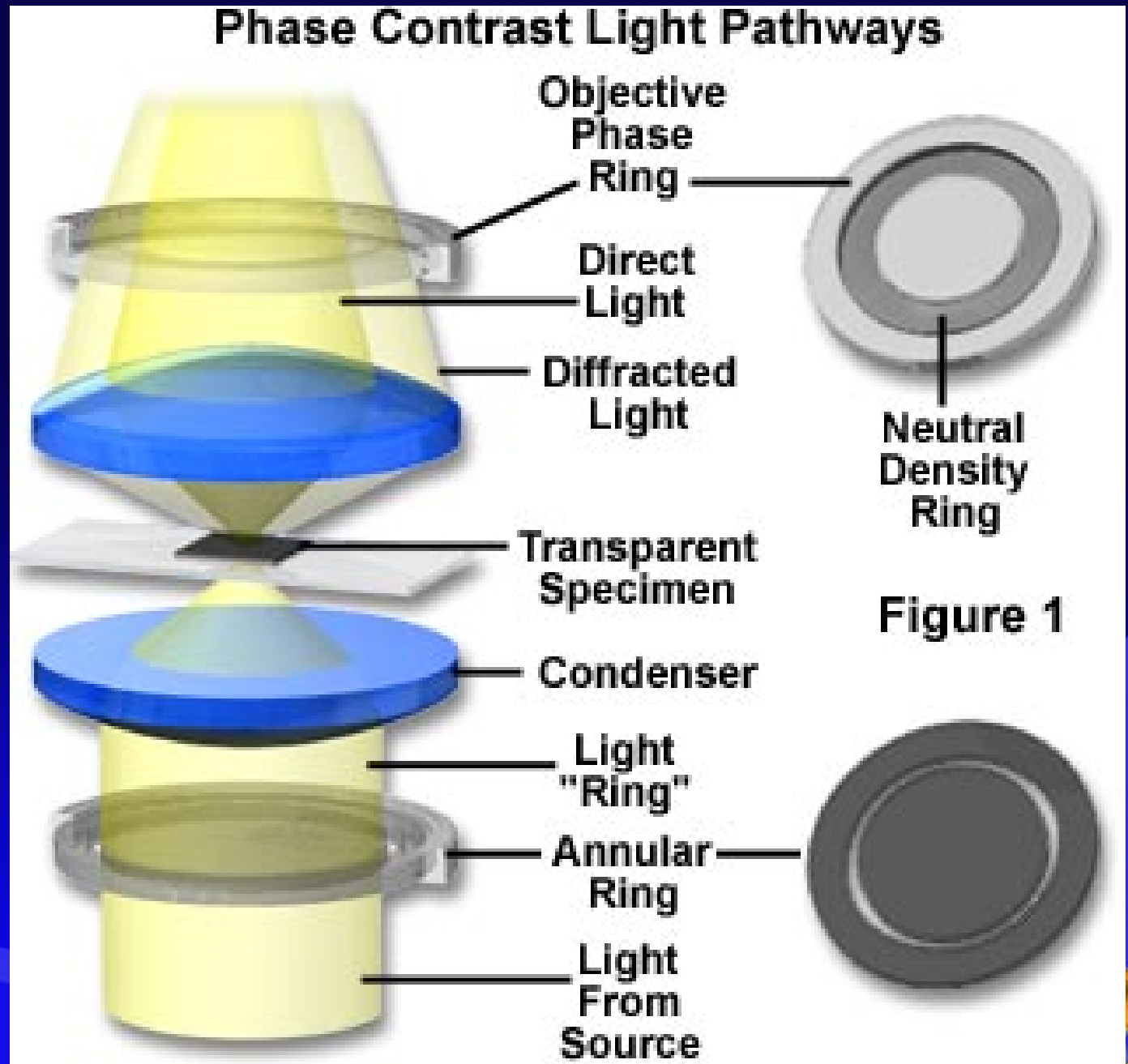


(五) 相差显微镜

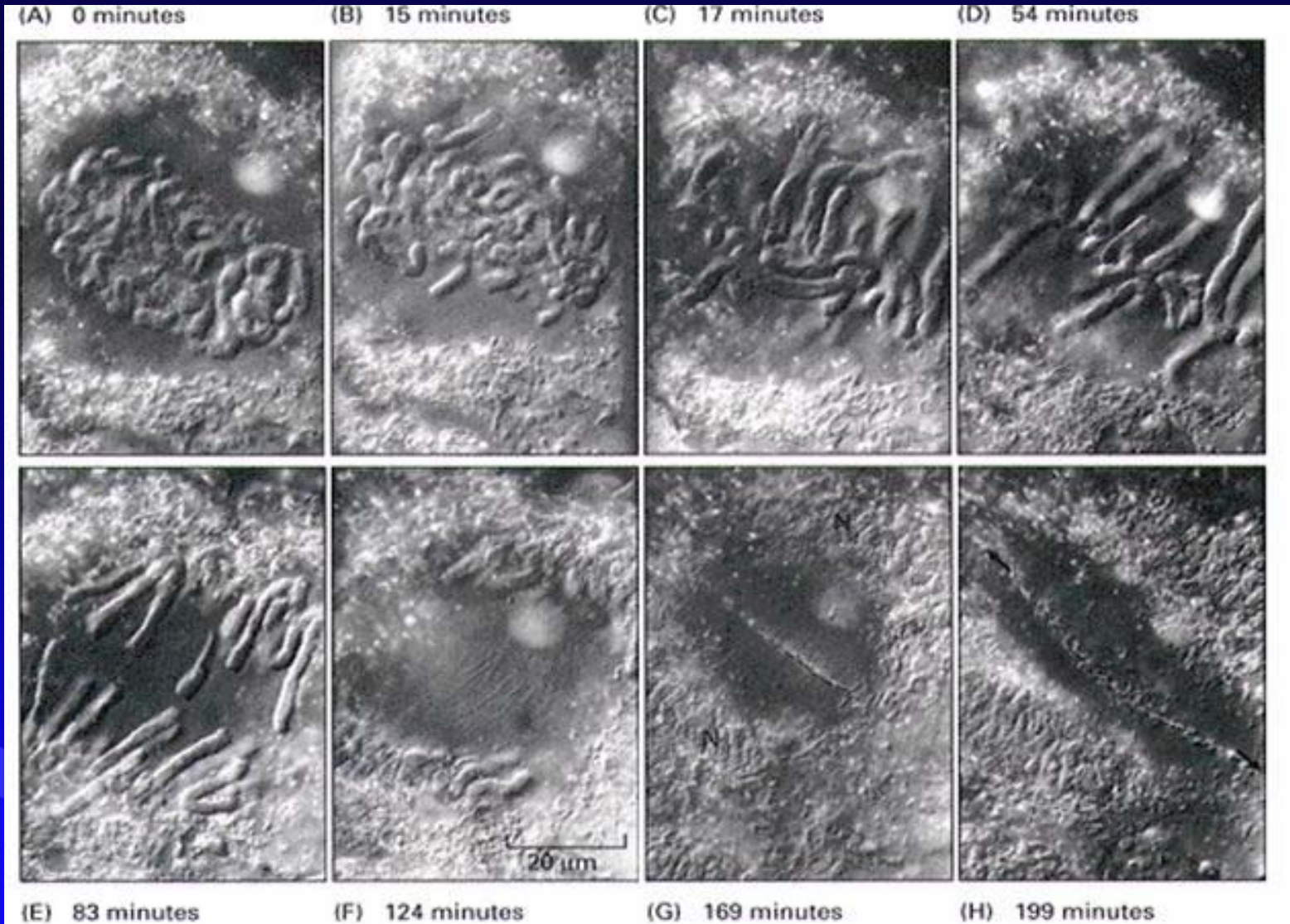
- 把透过标本的可见光的光程差变成振幅差，从而提高了各种结构间的对比度，使各种结构变得清晰可见。在构造上，相差显微镜有不同于普通光学显微镜两个特殊之处。
 1. 环形光阑 (annular diaphragm)：位于光源与聚光器之间。
 2. 相位板 (annular phaseplate)：物镜中加了涂有氟化镁的相位板，可将直射光或衍射光的相位推迟 $1/4\lambda$ 。



原理

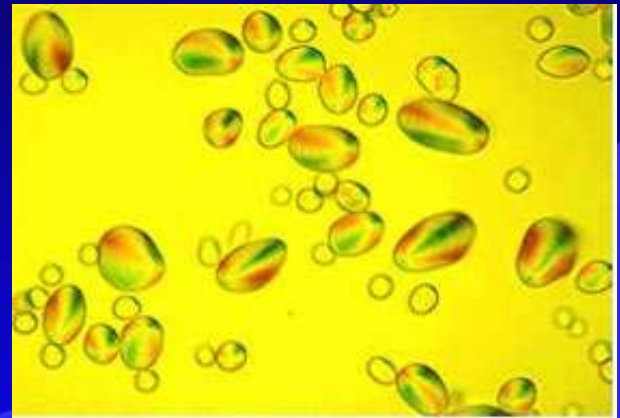


用途：观察未经染色的玻片标本。



(六) 偏光显微镜 polarizing microscope

- 用于检测具有双折射性的物质，如纤维丝、纺锤体、胶原、染色体等。
- 进入显微镜的光线为偏振光，镜筒中有检偏器（与起偏器方向垂直的偏振片）。
- 载物台可以旋转。

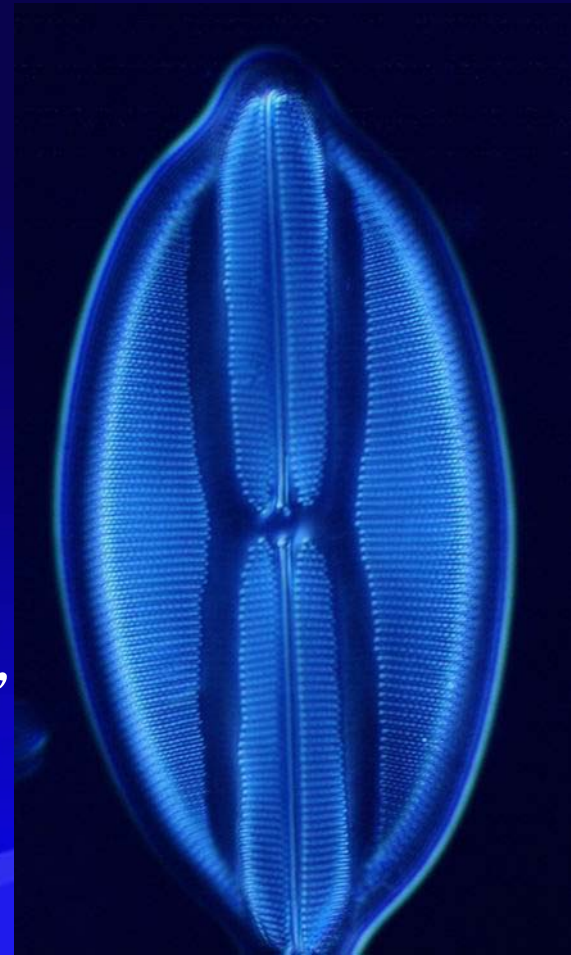


淀粉



（七）微分干涉差显微镜 Differential interference contrast microscope (DIC)

- 1952年Nomarski发明，利用两组平面偏振光的干涉，加强影像的明暗效果，能显示结构的三维立体投影。标本可略厚一点，折射率差别更大，故影像的立体感更强。



(八) 倒置显微镜 inverse microscope

- 物镜与照明系统颠倒；
- 用于观察培养的活细胞，通常具有相差或DIC物镜，有的还具有荧光装置。



(九) 当代显微镜的发展趋势

- 采用组合方式，集普通光镜、相差、荧光、暗视野、DIC、摄影装置于一体；
- 自动化与电子化。





<http://www.cella.cn>

二、电子显微镜

(一) 透射电子显微镜

transmission electron microscope, TEM



1. 原理

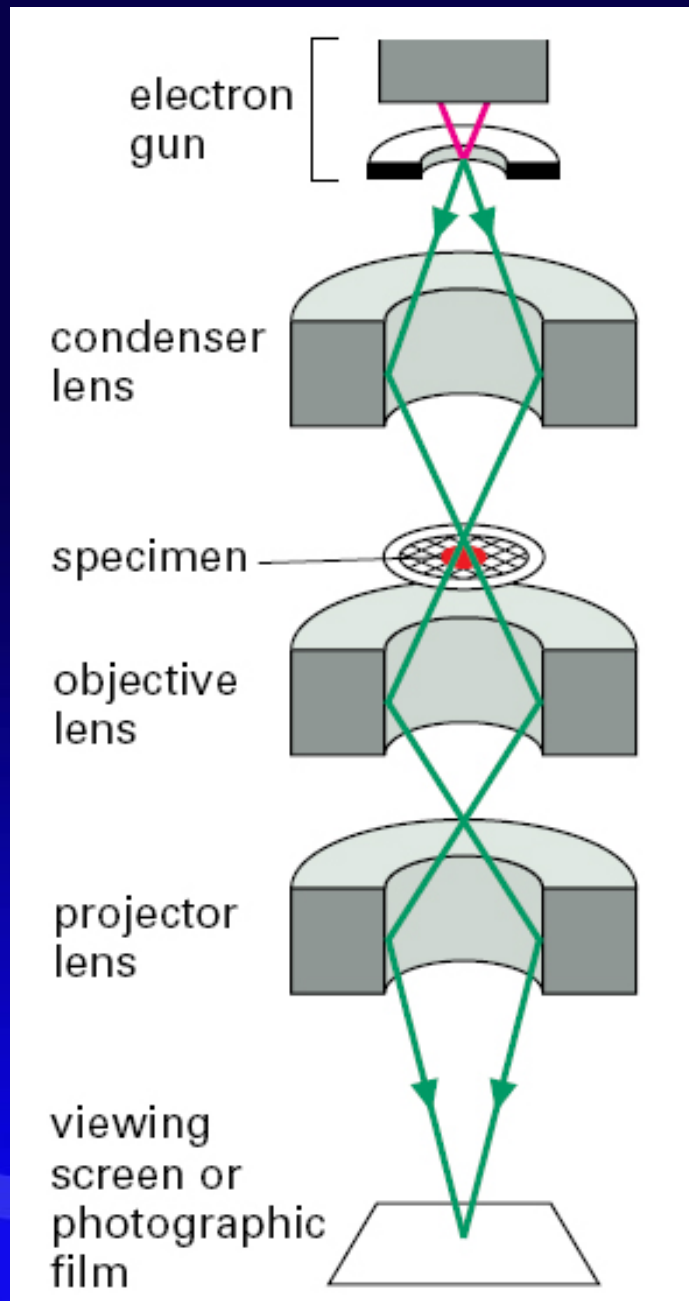
- 以电子束作光源，电磁场作透镜。电子束波长与加速电压(通常50~120KV)的平方根成反比；
- 由电子照明系统、电磁透镜成像系统、真空系统、记录系统、电源系统等5部分构成；
- 分辨力0.2nm，放大倍数可达百万倍；
- 用于观察超微结构（小于0.2 μm ）。



表二、不同光线的波长

| 名 称 | 可见光 | 紫外光 | X 射线 | α 射线 | 电子束 | |
|---------|---------|--------|---------|-------------|-------|--------|
| | | | | | 0.1Kv | 10Kv |
| 波长 (nm) | 390~760 | 13~390 | 0.05~13 | 0.005~1 | 0.123 | 0.0122 |

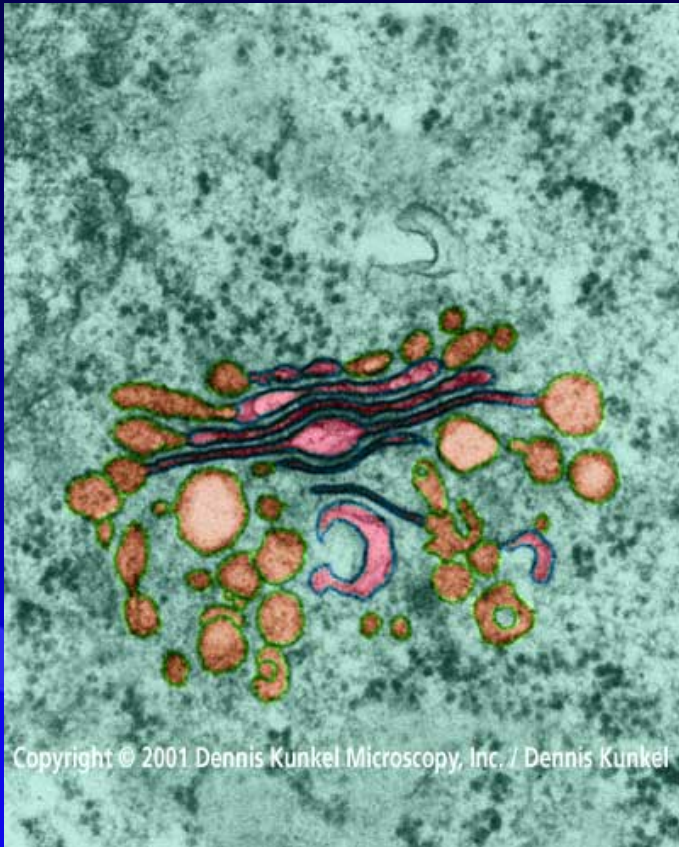




TEM LIGHT PATHWAY



TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE, TEM



2. 制样技术

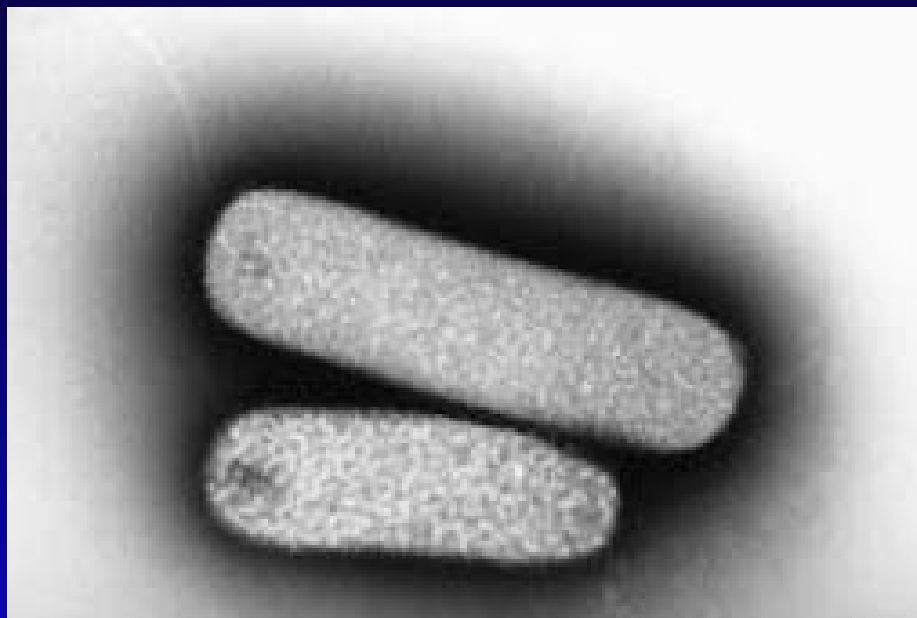
- 1) 超薄切片
- 超薄切片厚度仅50nm左右，用超薄切片机（ultramicrotome）制作。
- 通常以锇酸和戊二醛固定样品，丙酮逐级脱水，环氧树脂包埋，以热膨胀或螺旋推进的方式切片，重金属（铀、铅）盐染色。





2) 负染技术

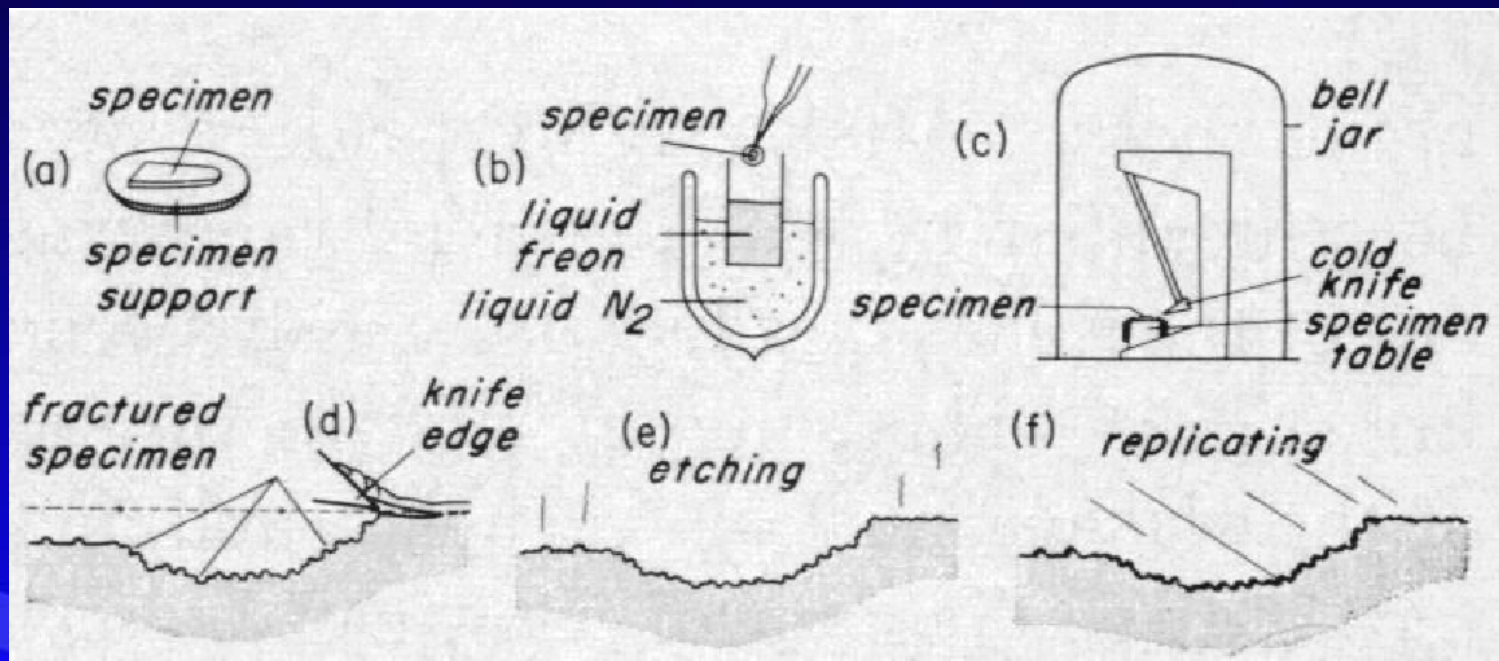
- 用重金属盐(如磷钨酸)染色；吸去染料干燥后，样品凹陷处铺了一层重金属盐，而凸的出地方没有染料沉积，从而出现负染效果，分辨力可达1.5nm左右。



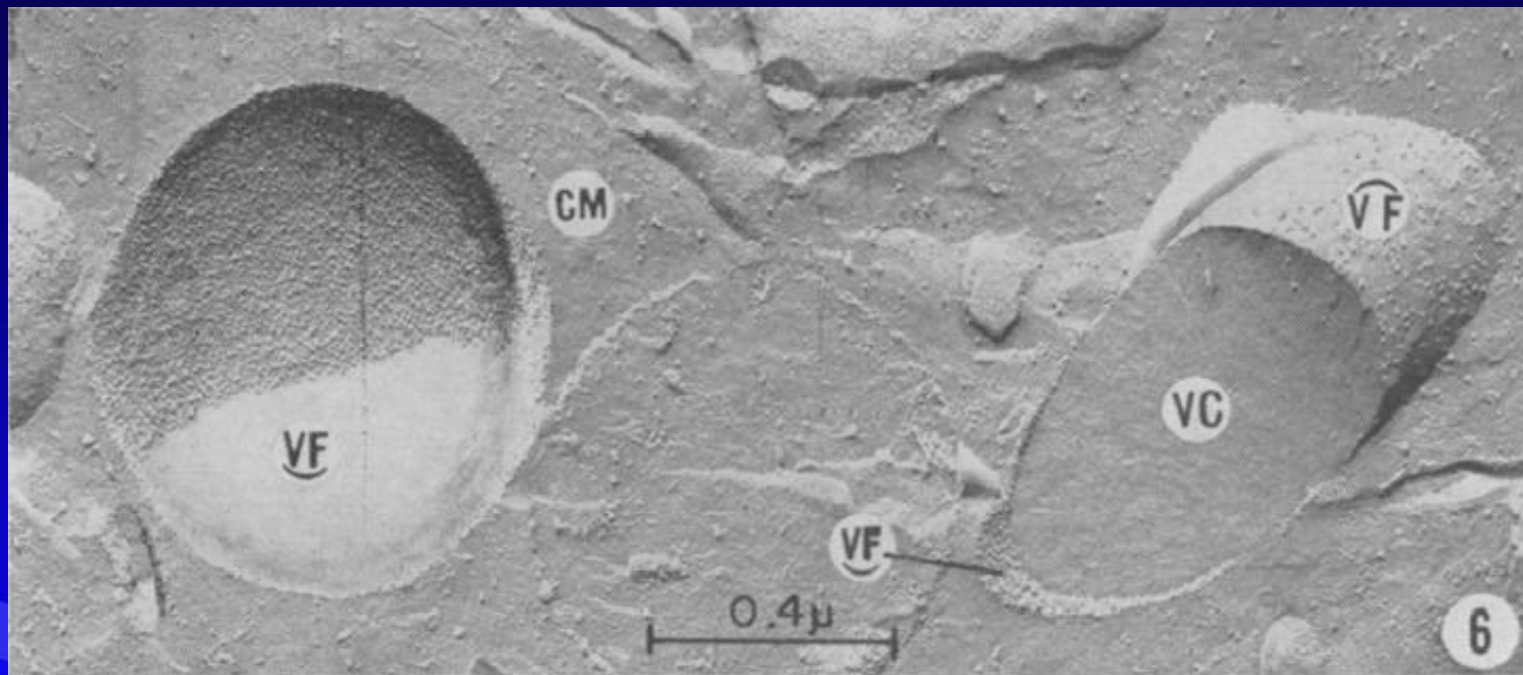
Negative Stained
Archaeobacteria

3) 冰冻蚀刻 freeze-etching

- 亦称冰冻断裂。标本置于干冰或液氮中冰冻。然后断开，升温后，冰升华，暴露断面结构。向断面喷涂一层蒸汽铂和碳。然后将组织溶掉，把铂和碳的膜剥下来，此膜即为复膜（replica）。

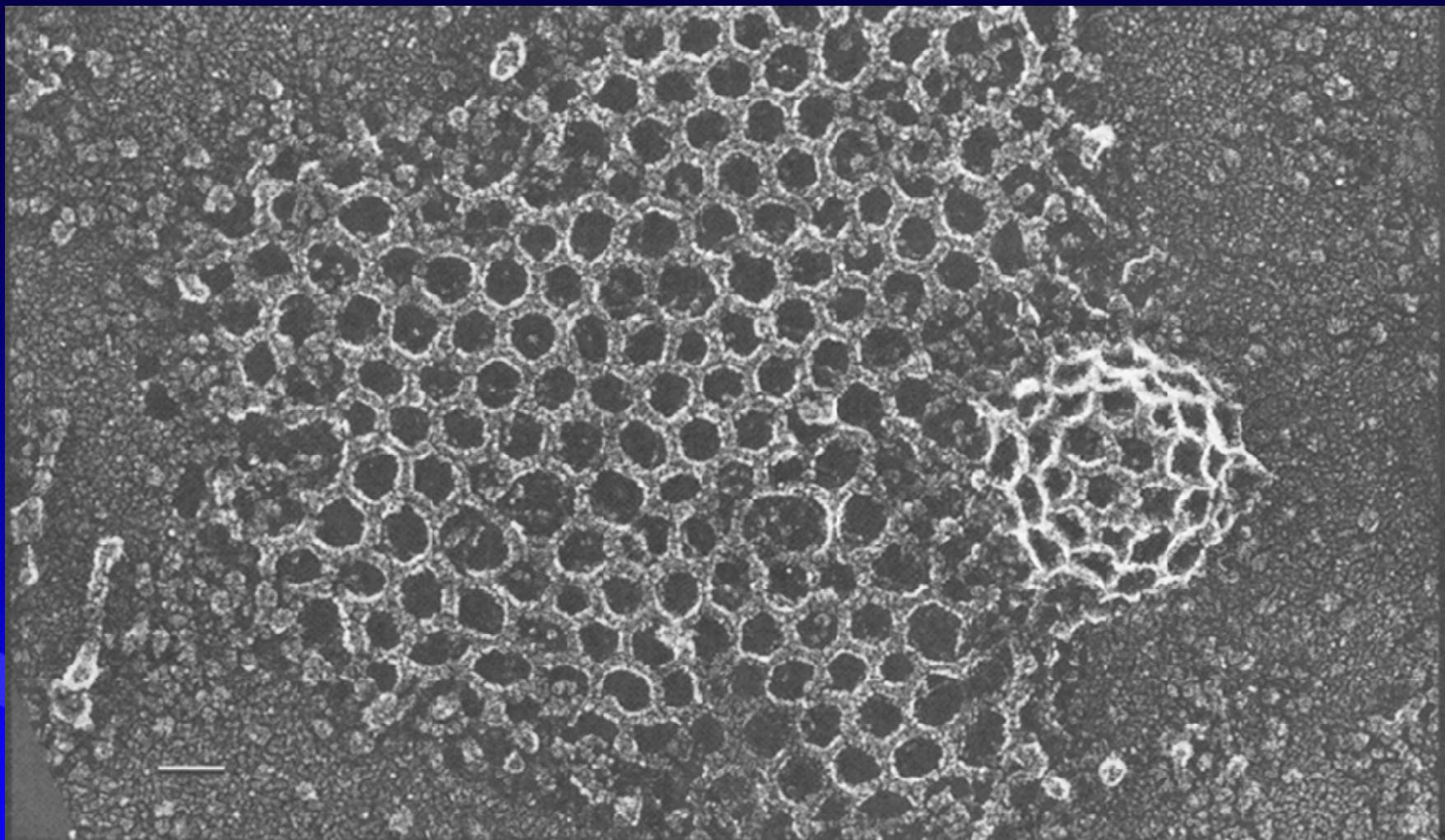


- 断面的三种处理方法：
- 蚀刻（etching）、不蚀刻（no etching）、深度蚀刻（deep etching）



an onion root tip cell with no etching.

培养细胞内面的深度蚀刻电镜照片，示Clathrin衣被

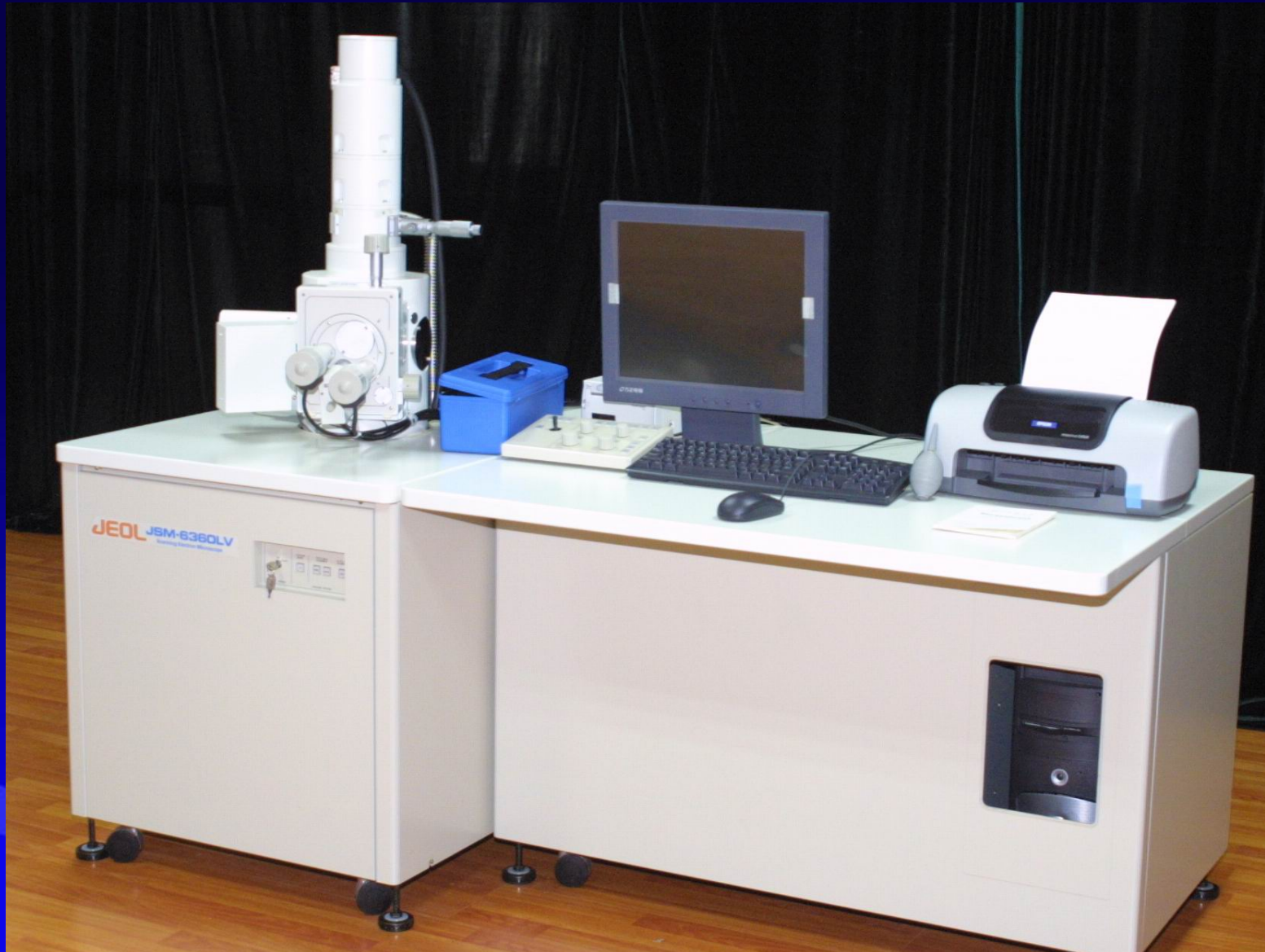


(二) 扫描电子显微镜

- 20世纪60年代问世，用来观察标本表面结构；
- 分辨力为6~10nm，因人眼的分辨力（区别荧光屏上距离最近两个光点的能力）为0.2mm，扫描电镜的有效放大倍率为 $0.2\text{mm}/10\text{nm}=20000\text{X}$ 。



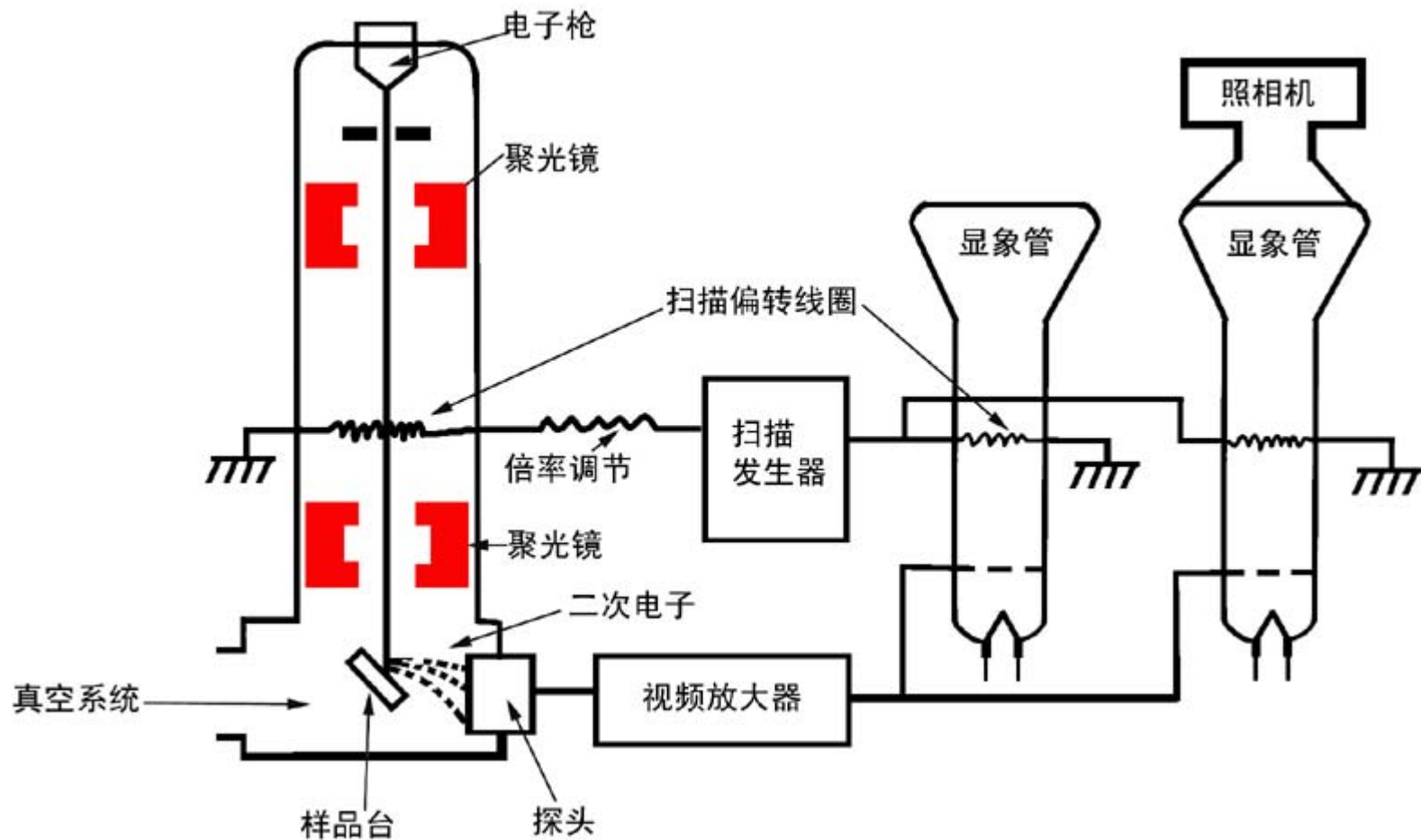
Scanning electron microscope (SEM)

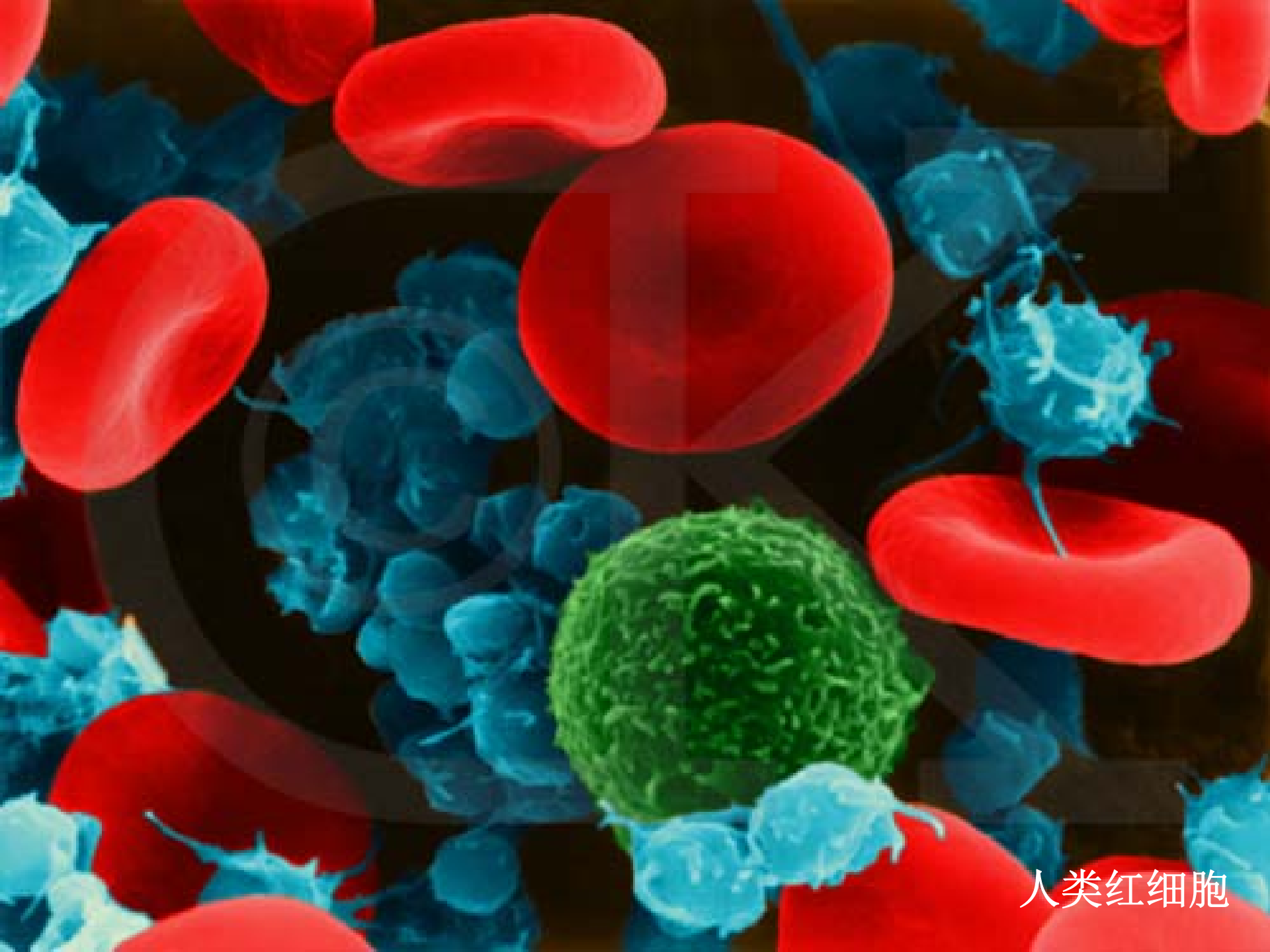


- 工作原理：是用一束极细的电子束扫描样品，在样品表面激发出次级电子，次级电子的多少与样品表面结构有关，次级电子由探测器收集，信号经放大用来调制荧光屏上电子束的强度，显示出与电子束同步的扫描图像。
- 为了使标本表面发射出次级电子，标本在固定、脱水后，要喷涂上一层重金属膜，重金属在电子束的轰击下发出次级电子信号。



SEM LIGHT PATHWAY

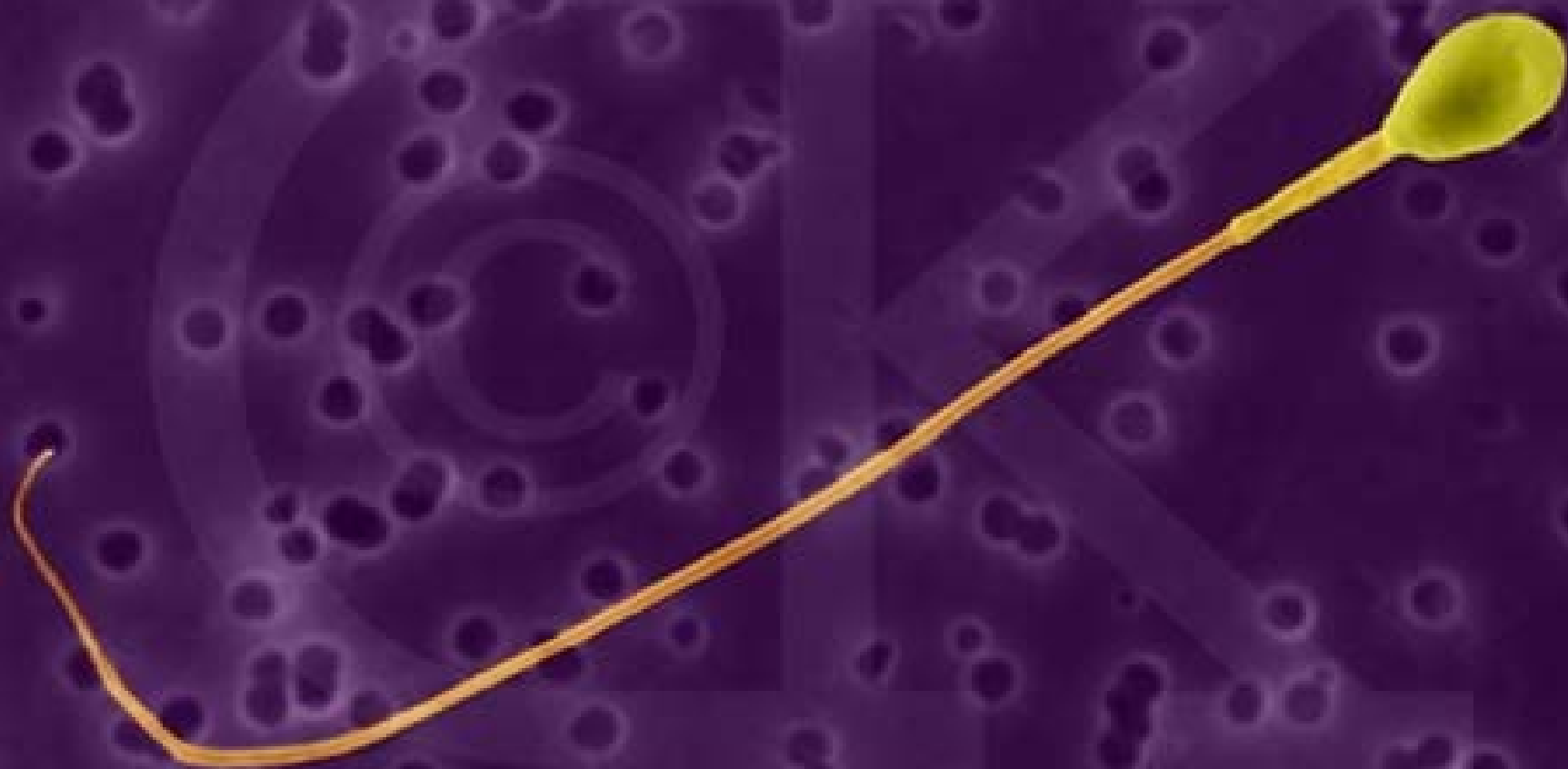




人类红细胞



酵母



人类精子

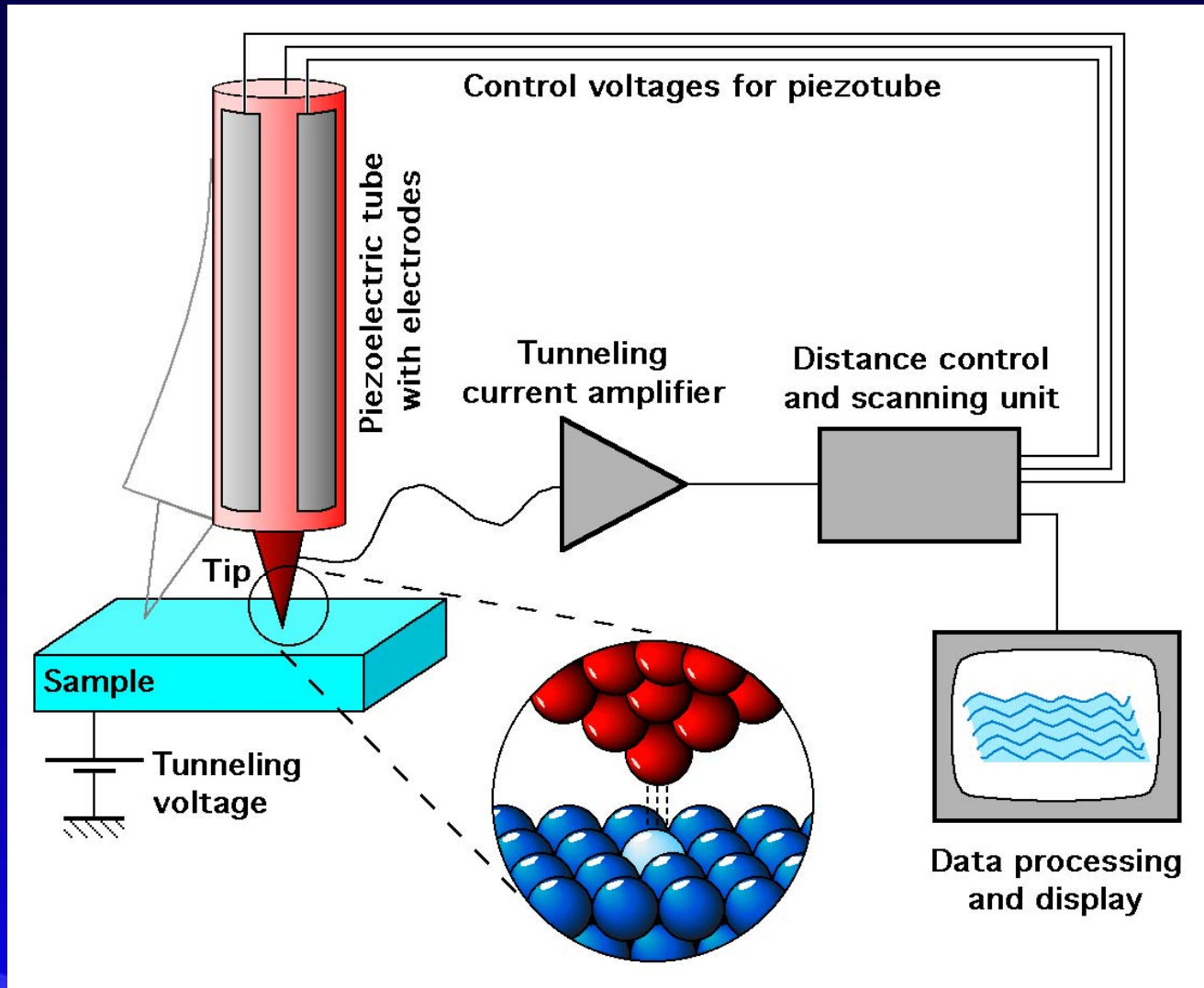
（三）扫描隧道显微镜

scanning tunneling microscope, STM

- 原理：根据隧道效应设计，当原子尺度的针尖在不到一个纳米的高度上扫描样品时，此处电子云重叠，外加一电压（ $2\text{mV}\sim 2\text{V}$ ），针尖与样品之间形成隧道电流。电流强度与针尖和样品间的距离有函数关系，将扫描过程中电流的变化转换为图像，即可显示出原子水平的凹凸形态。
- 分辨率：横向为 $0.1\sim 0.2\text{nm}$ ，纵向可达 0.01nm 。
- 用途：三态（固态、液态和气态）物质均可进行观察。



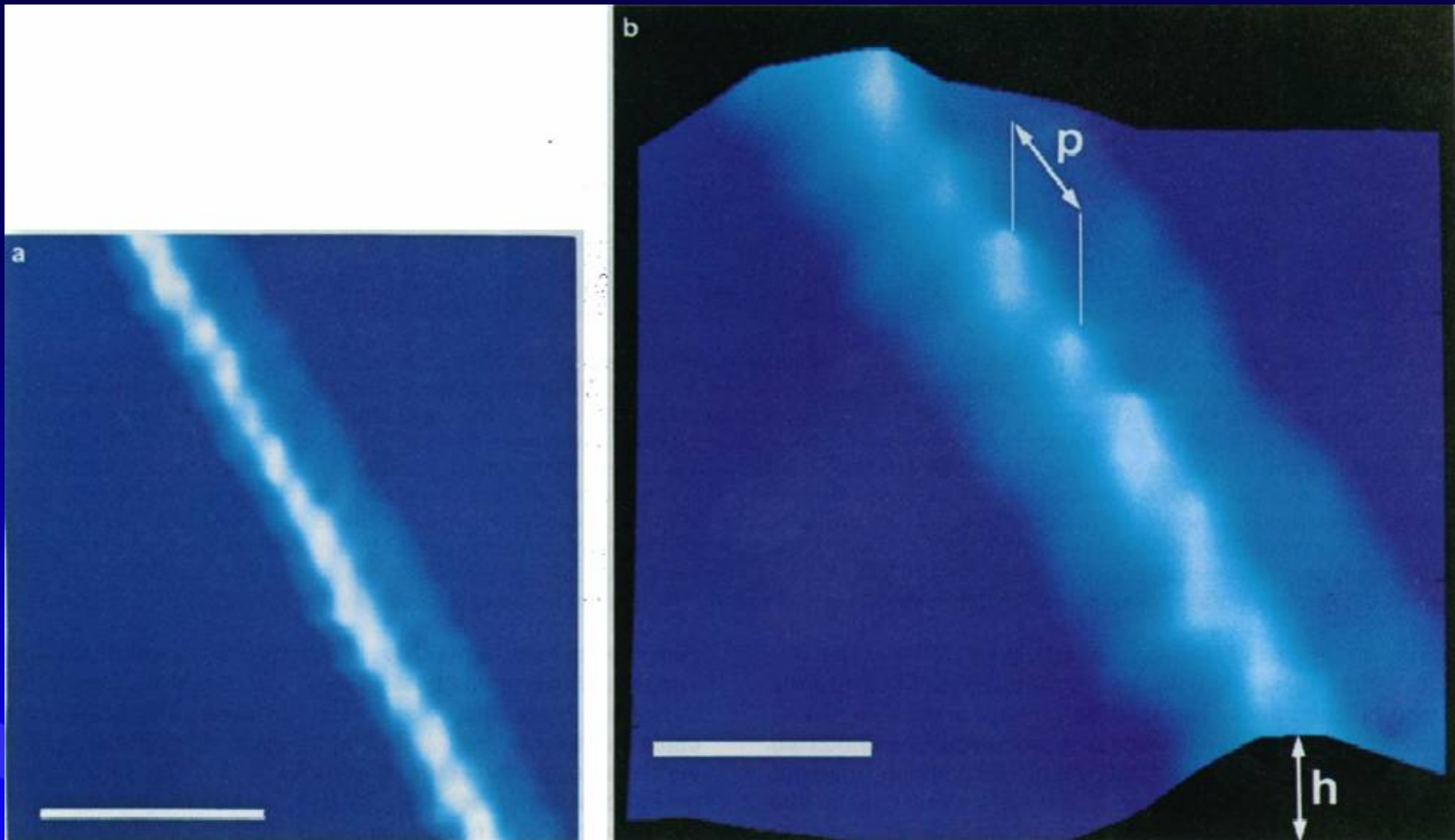
扫描隧道显微镜原理



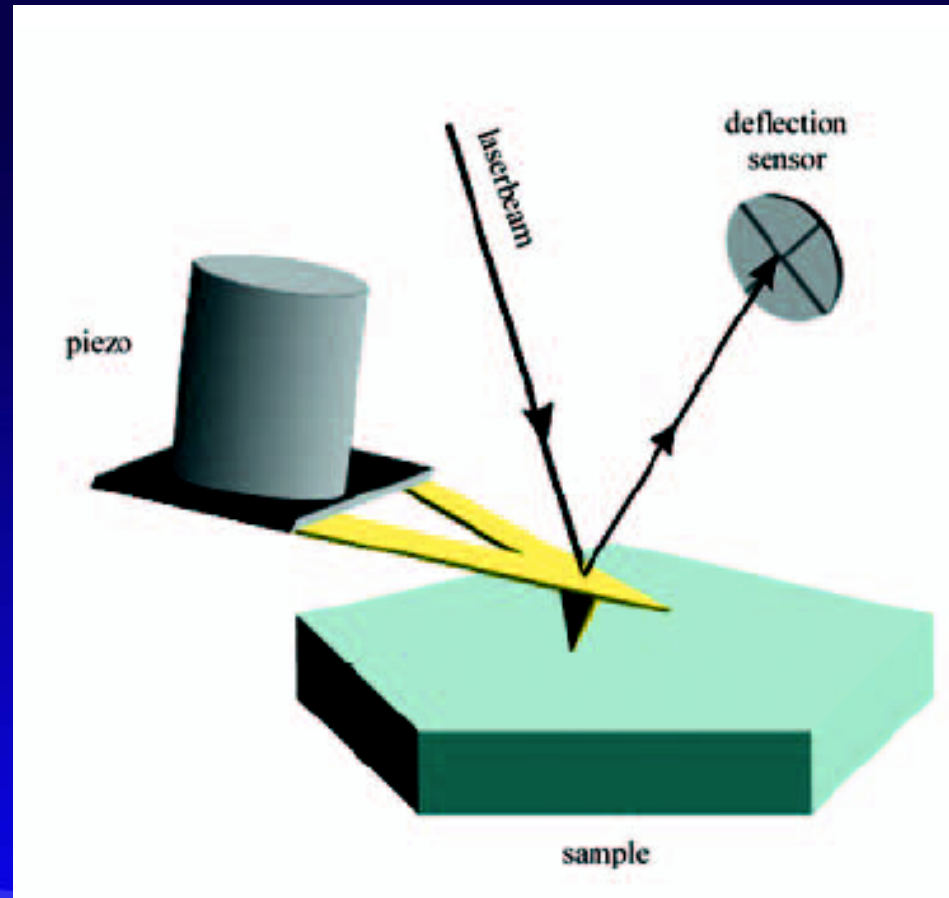
引自 <http://www.iap.tuwien.ac.at>



STM image of a DNA molecule



Schematic drawing of AFM



三、显微操作技术

micromanipulation technique

- 是在倒置显微镜下利用显微操作器进行细胞或早期胚胎操作的一种方法。
- 包括细胞核移植、显微注射、嵌合体技术、胚胎移植以及显微切割等。
 - 细胞核移植技术已有几十年的历史，1952年，Briggs和King等将不同阶段的蛙胚细胞核注入去核的蛙卵，构建核移植胚。Gordon（1962）证明原肠胚以后的细胞核移植能发育到成体。1997年，Wilmut等克隆了绵羊Dolly。



显微操作仪



转基因显微操作过程





<http://www.cella.cn>

第二节 生物化学与分子生物学技术

一、细胞化学技术



- 组织化学和细胞化学染色方法用于对某些细胞成分进行定性和定位研究。

- (一) 固定

1. 物理固定：血膜空气干燥、冷冻干燥。
2. 化学固定：如甲醇、乙醇、丙酮、甲醛、戊二醛和锇酸等试剂。显示多糖常用乙醇固定，显示酶类多用甲醛丙酮缓冲液固定。



(二) 显示方法

1. 金属沉淀法：如磷酸酶分解磷酸酯底物后，反应产物最终生成CoS或PbS有色沉淀，而显示出酶活性。
2. Schiff反应：醛基可使Schiff试剂中的无色品红变为红色。用于显示糖和脱氧核糖核酸（Feulgen反应）。
3. 联苯胺反应：过氧化酶分解 H_2O_2 。产生新生氧，后者再将无色联苯胺氧化成联苯胺蓝，进而变成棕色化合物。
4. 脂溶染色法：借苏丹染料溶于脂类而使脂类显色。
5. 茚三酮反应：显示蛋白质。



二、免疫细胞化学 immunocytochemistry

- 是利用抗体同特定抗原专一结合的原理，对抗原进行定位测定的技术。常用的标记物有荧光素和酶。
- 免疫荧光法（immunofluorescent technique）：如异硫氰酸荧光素、罗丹明等。
- 酶标免疫法（enzyme-labeled antibody method）：如辣根过氧化物酶。



三、放射自显影术

- 用于研究标记化合物在机体、组织和细胞中的分布、定位、排出以及合成、更新、作用机理、作用部位等等。
- 原理：将放射性同位素标记的化合物导入生物体内，经过一段时间后，制取切片，涂上卤化银乳胶，经放射性曝光，使乳胶感光。
- 一般用 ^{14}C 和 ^3H 标记。常用 ^3H -TDR来显示DNA，用 ^3H -UDR显示RNA；用 ^3H 氨基酸研究蛋白质，用 ^3H 甘露糖、 ^3H 岩藻糖研究多糖。
 - ^{14}C 半衰期为5730年， ^3H 为12.5年。

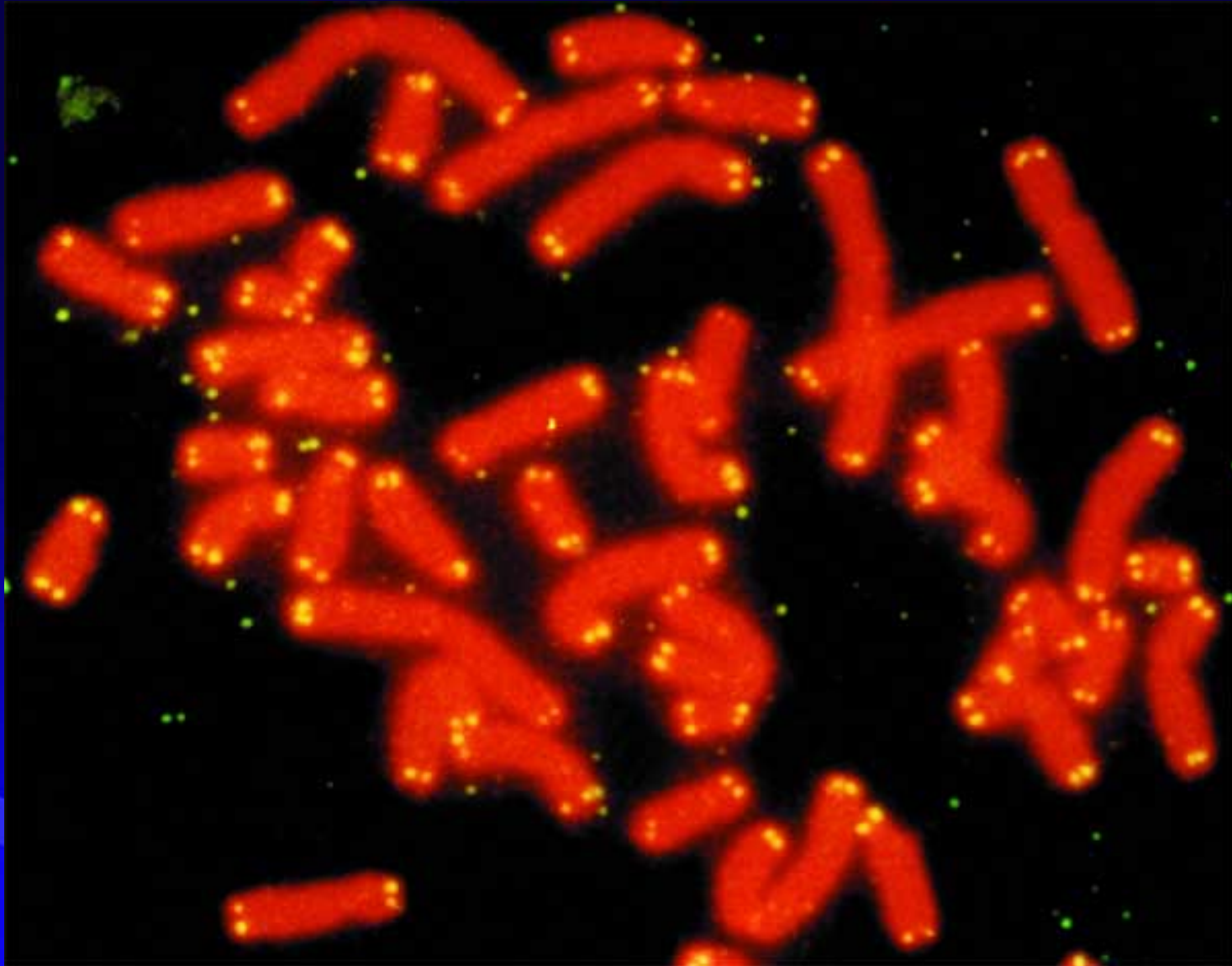


四、分子杂交技术

- 具有互补核苷酸序列的两条单链核苷酸分子片段，在适当条件下，通过氢键结合，形成DNA-DNA，DNA-RNA或RNA-RNA杂交的双链分子。这种技术可用来测定单链分子核苷酸序列间是否具有互补关系。
- （一）原位杂交（*in situ hybridization*）。
- 用于检测染色体上的特殊DNA序列。最初是使用放射性DNA探针，后来又发明了免疫探针法。



人类染色体端粒DNA的荧光原位杂交照片



(二) Southern杂交

- 是体外分析特异DNA序列的方法，操作时先用限制性内切酶将核DNA或线粒体DNA切成DNA片段，经凝胶电泳分离后，转移到醋酸纤维薄膜上，再用探针杂交，通过放射自显影，即可辨认出与探针互补的特殊核苷序列。
- 将RNA转移到薄膜上，用探针杂交，则称为Northern杂交。

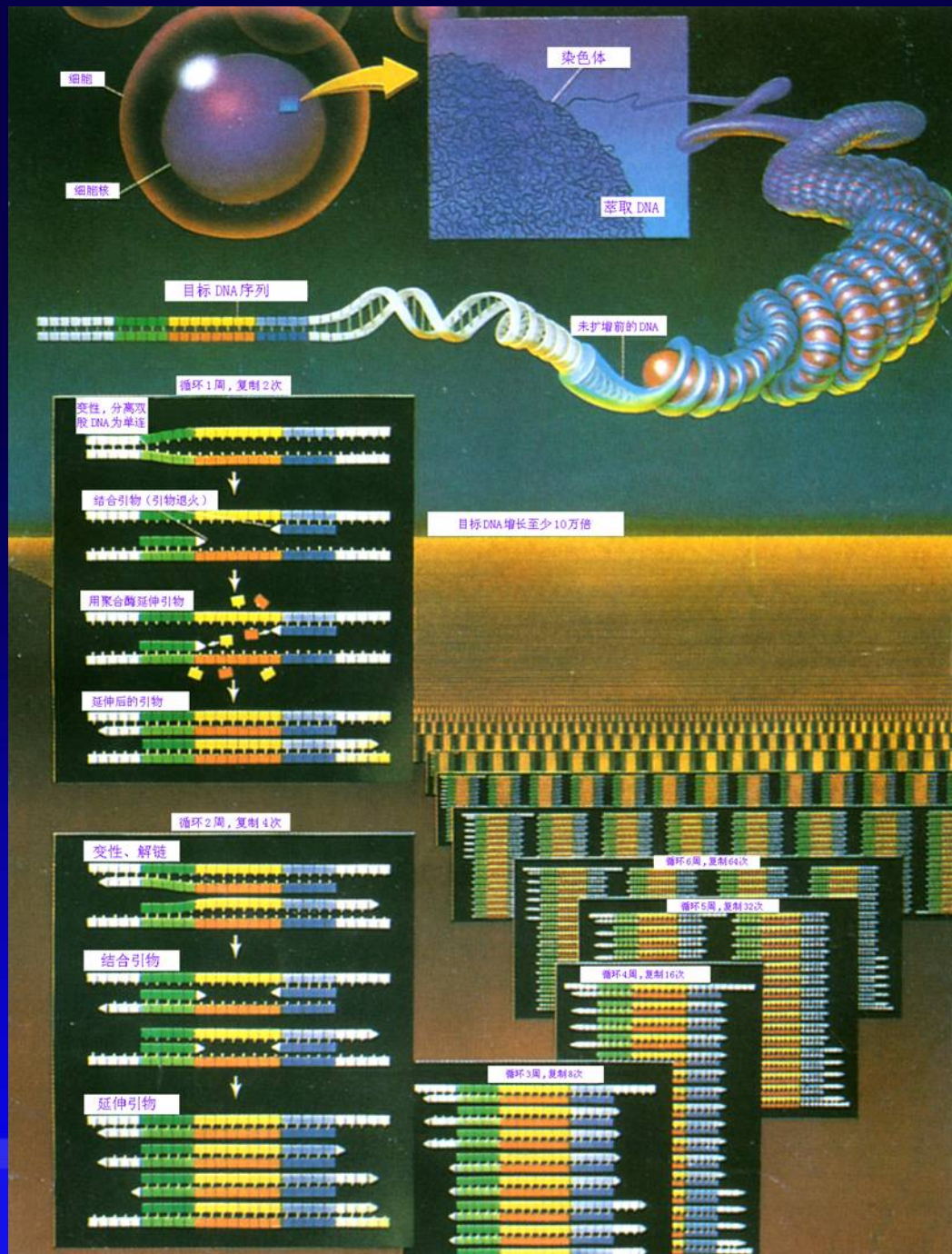


六、PCR 技术

- PCR即：polymerase chain reaction。
- 反应体系：①样品DNA；②引物（primer），约15-20个核苷酸；③4种dNTP；④Tag DNA聚合酶，来自于嗜热水生菌*Thermus aquaticus*，最适作用温度75~80℃，短时间在95℃下不失活。⑤缓冲体系和Mg²⁺。
- 反应过程：①变性：约90-95℃；②复性：约60℃左右；③延伸：70-75℃；④重复“变性——复性——延伸”过程20-30次循环。



PCR原理





<http://www.cella.cn>

第三节 细胞分离技术



Dr Tian 2008

一、离心技术

- 是分离细胞器及各种大分子基本手段。
- 转速 $10\sim 25\text{kr}/\text{min}$ 的离心机称为高速离心机。
- 转速 $>25\text{kr}/\text{min}$ ，离心力 $>89\text{Kg}$ 者称为超速离心机。
- 超速离心机的最高转速可达 $100000\text{r}/\text{min}$ ，离心力超过 500kg 。

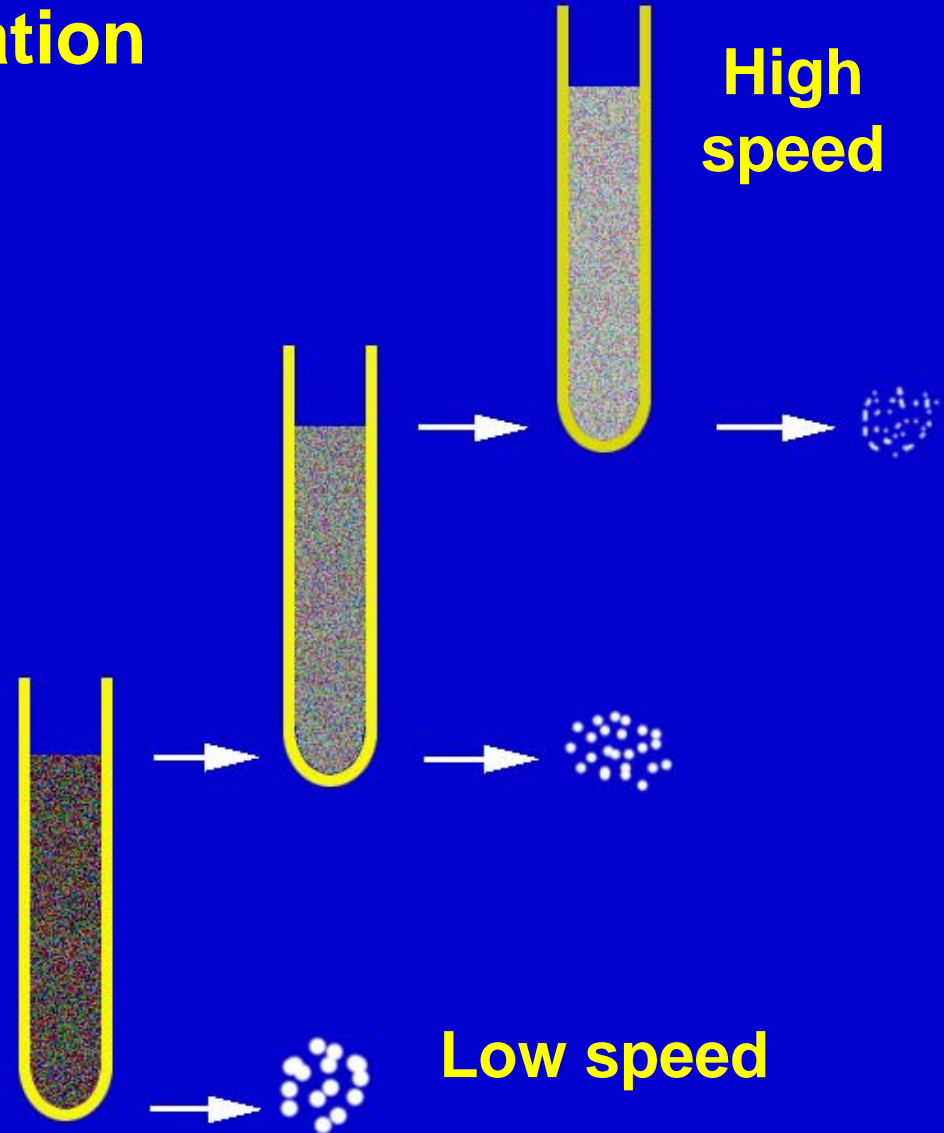


(一) 差速离心 Differential centrifugation

- 特点：
 - 介质密度均一；
 - 速度由低向高，逐级离心。
- 用途：分离大小相差悬殊的细胞和细胞器。
- 沉降顺序：核——线粒体——溶酶体与过氧化物酶体——内质网与高基体——核蛋白体。
- 可将细胞器初步分离，常需进一步通过密度梯离心再行分离纯化。



Differential centrifugation



(二) 密度梯度离心

- 用介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过离心力场的作用使细胞和细胞成分分层、分离。
- 类型：速度沉降、等密度沉降。
- 常用介质：氯化铯、蔗糖、多聚蔗糖。
- 分离活细胞的介质要求：
 - 1) 能产生密度梯度，且密度高时，粘度不高；
 - 2) PH中性或易调为中性；
 - 3) 浓度大时渗透压不大；
 - 4) 对细胞无毒。



1. 速度沉降 velocity sedimentation

- 用途：分离密度相近而大小不等的细胞或细胞器。
- 特点：介质密度较低，介质的最大密度应小于被分离生物颗粒的最小密度。
- 原理：介质密度梯度平缓，分离物按各自的沉降系数以不同的速度沉降而达到分离。

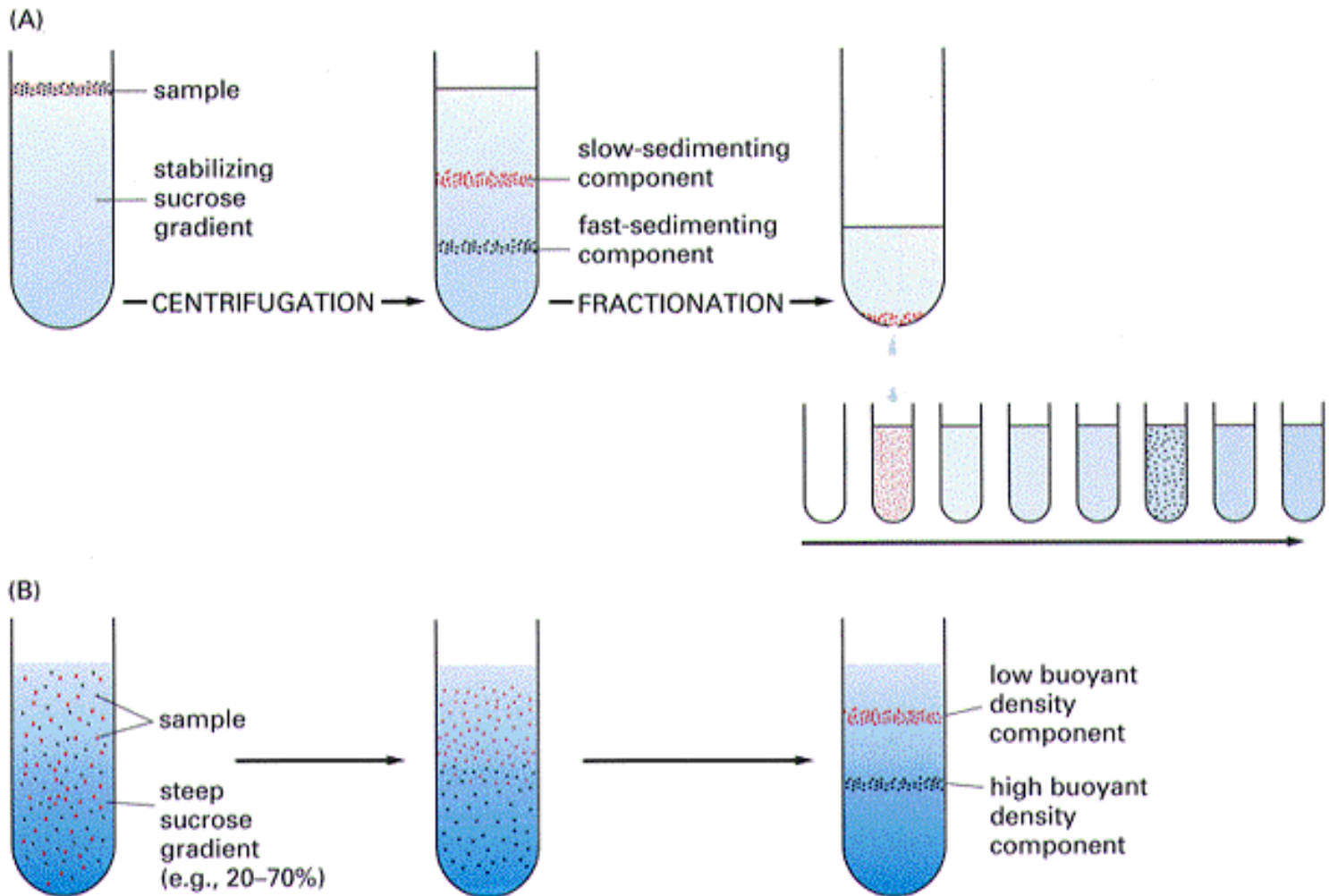


2.等密度沉降 isopycnic sedimentation

- 用途：分离密度不等的颗粒。
- 特点：
 - 介质密度高，陡度大，介质最高密度大于被分离组分的最大密度。
 - 力场比速率沉降法大10~100倍，需要高速或超速离心。
- 原理：样品各成分在连续梯度的介质中经过一定时间的离心则沉降到与自身密度相等的介质处，并停留在那里达到平衡，从而将不同密度的成分分离。



Velocity (A) and Equilibrium (B) sedimentation



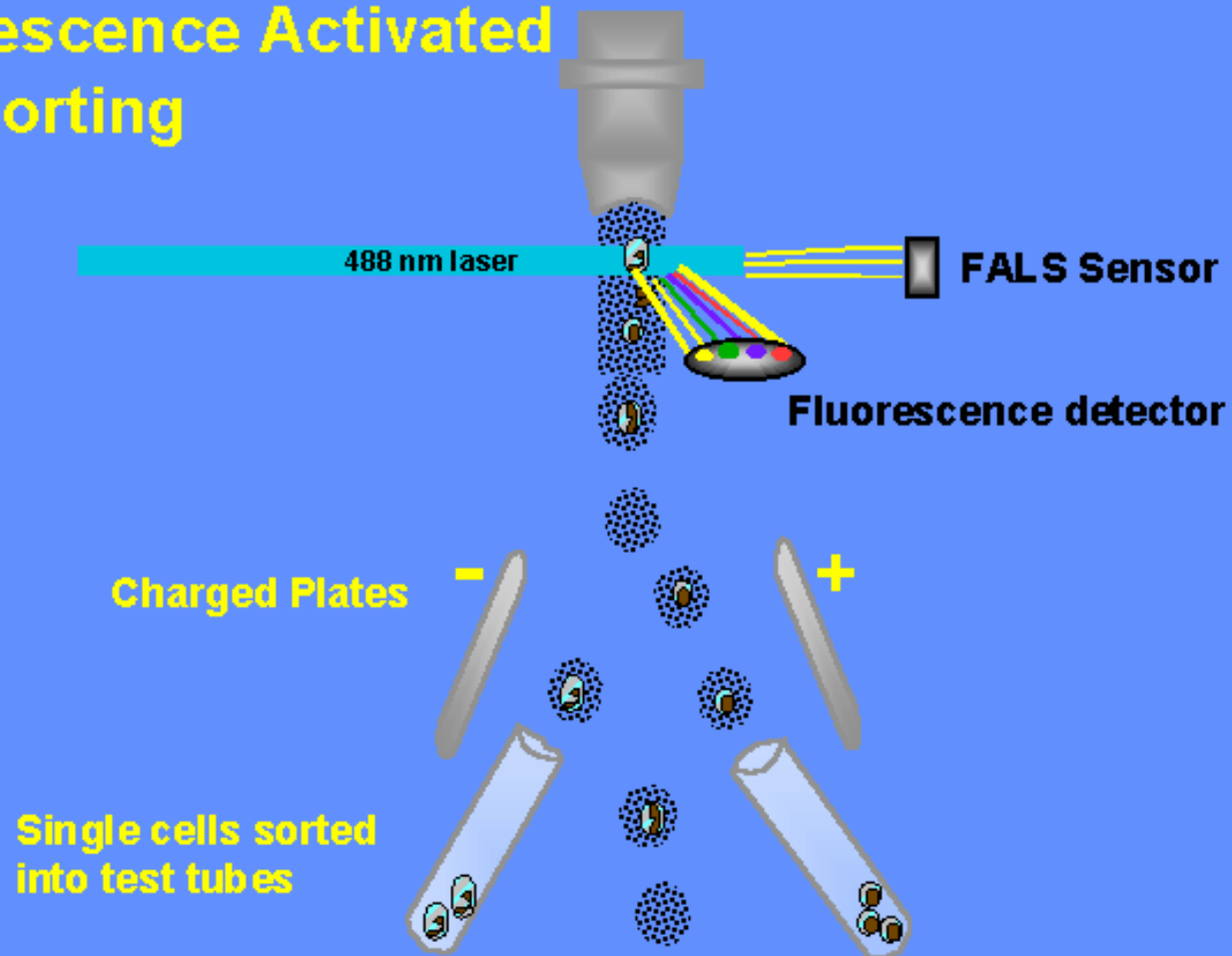
From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

二、流式细胞术

- 用途：对单个细胞进行快速定量分析与分选的一门技术。
- 原理：包在鞘液中的细胞通过高频振荡控制的喷嘴，形成包含单个细胞的液滴，在激光束的照射下，这些细胞发出散射光和荧光，经探测器检测，转换为电信号，送入计算机处理，输出统计结果，并可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群，分离纯度可达99%。包被细胞的液流称为鞘液，所用仪器称为流式细胞计（flow cytometer）。



Fluorescence Activated Cell Sorting



三、细胞电泳

- 原理：在一定PH值下细胞表面带有净的正或负电荷，能在外加电场的作用下发生泳动。
- 各种细胞或处于不同生理状态的同种细胞荷电量有所不同，故在一定的电场中的泳动速度不同。
- 用途：检测细胞生理状态、分离不同种类的细胞。





<http://www.cella.cn>

第四节 细胞培养与细胞杂交

一、细胞培养

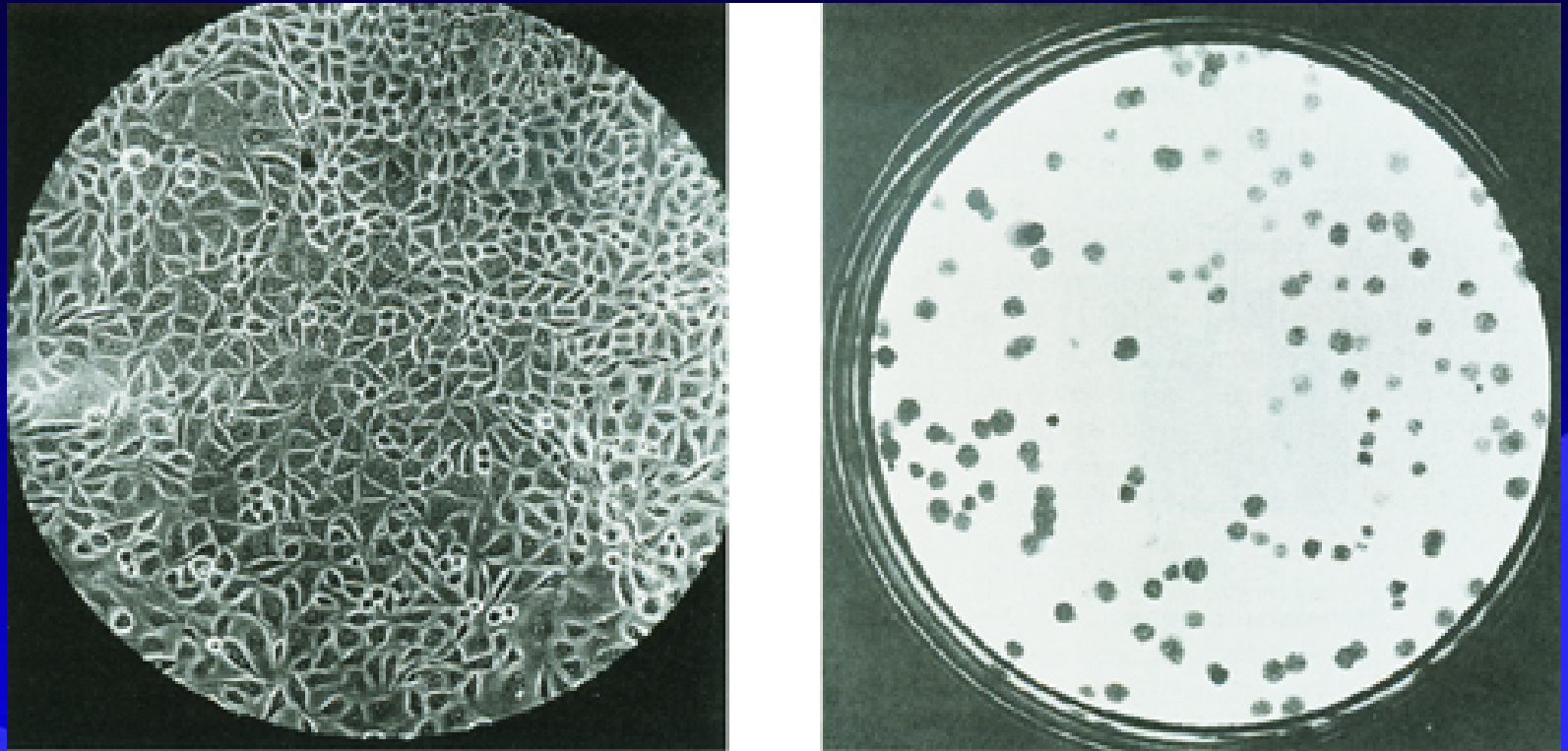


（一）动物细胞培养

- 群体培养（mass culture）：将含有一定数量细胞的悬液置于培养瓶中，让细胞贴壁生长，汇合（confluence）后形成均匀的单细胞层；
- 克隆培养（clonal culture）：培养高度稀释的细胞悬液，细胞贴壁生长，每一个细胞形成一个细胞集落，称为克隆。



群体培养（左）和克隆培养（右）



- 原代培养（primary culture）：即：培养来自动物机体的细胞群。将细胞转移到新的容器中培养称为传代或传代培养（passage），每代细胞分裂约3-6次。
- 细胞系（cell line）：原代培养细胞成功传代即为细胞系。
- 细胞株（cell strain）：从培养细胞中筛选出的具有特定性质或标志的细胞群。
- 克隆（clone）：亦称无性系。指由同一个祖先细胞通过有丝分裂产生的遗传性状一致的细胞群。



表三、实验室中常用的几种细胞系

| 细胞系名称 | 细胞类型 | 来源 |
|---------|---------|-----------------|
| 3T3 | 成纤维细胞 | 小鼠 |
| HeLa | 宫颈癌上皮细胞 | Henrietta Lacks |
| BHK21 | 成纤维细胞 | 叙利亚仓鼠 |
| PtKI | 上皮细胞 | 袋鼠 |
| L6 | 成肌细胞 | 大鼠 |
| PCI2 | 嗜铬细胞 | 大鼠 |
| SP2 | 浆细胞 | 小鼠 |
| SP2 / 0 | 骨髓瘤浆细胞 | 小鼠 |
| CHO | 卵巢细胞 | 中国地鼠 |

Henrietta Lacks, American black ,died of cancer of uterine cervix in 1951



(二) 植物细胞培养

1. 外植体培养：诱发产生愈伤组织。用于研究植物的生长发育、分化和变异；进行无性繁殖；制取代谢产物。
2. 悬浮细胞培养：适合于进行产业化大规模细胞培养，制取植物代谢产物。
3. 原生质体培养：培养脱壁后的细胞，特点：
 - ①比较容易摄取外来的遗传物质，如DNA；
 - ②便于进行细胞融合，形成杂交细胞；
 - ③适宜条件下可产生细胞壁，经诱导分化成完整植株。
4. 单倍体培养：通过花药或花粉培养可获得单倍体植株。



Plant Cell Culture

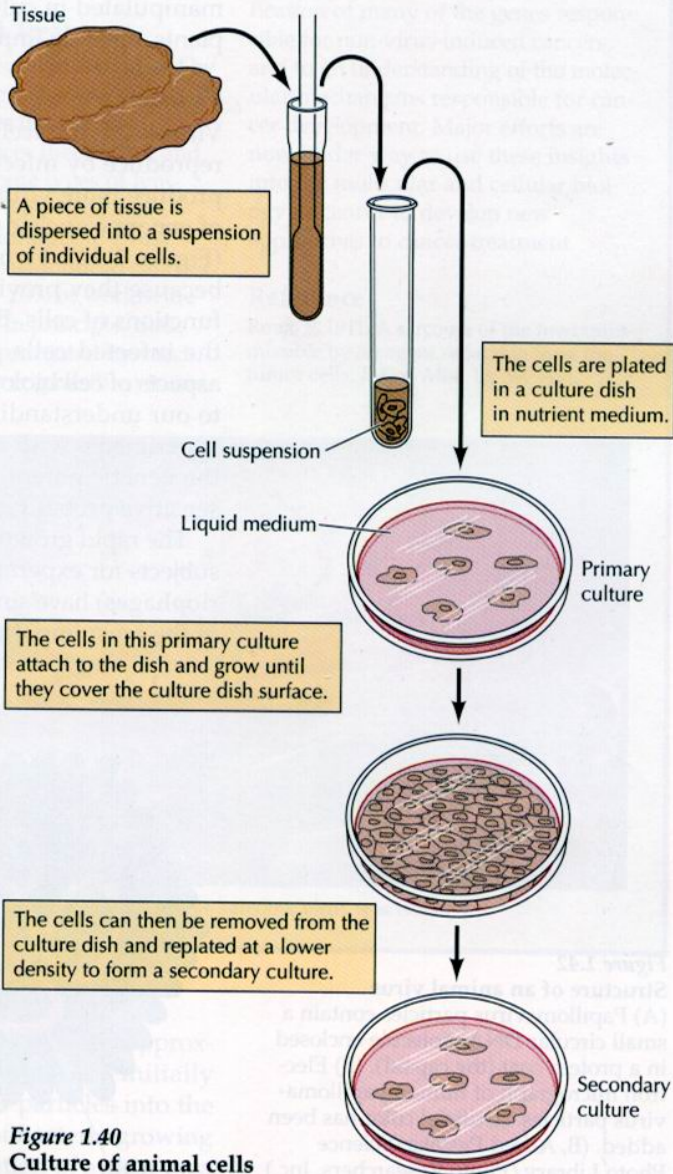


Figure 1.40
Culture of animal cells

← **Animal Cell Culture**



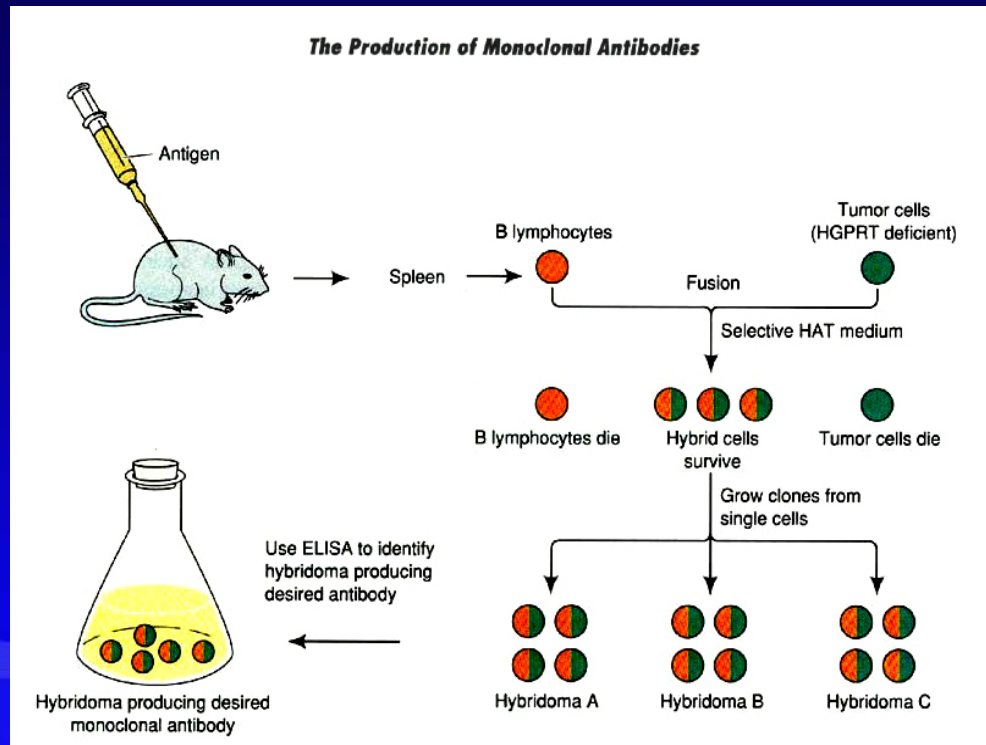
二、细胞融合

- 通过培养和介导，两个或多个细胞合并成一个双核或多核细胞的过程称为细胞融合（cell fusion）或细胞杂交。
- 同核体：相同基因型的细胞融合而成。
- 异核体：不同基因型的细胞融合而成。
- 自发融合：同种细胞在培养过程中自发合并的现象。
- 诱发融合：异种间的细胞必须经诱导剂处理才能融合。
- 诱导细胞融合的方法：生物方法（仙台病毒、副流感病毒和新城鸡瘟病毒）、化学方法（聚乙二醇PEG）、物理方法（电击和激光）。



•单克隆抗体技术

- B淋巴细胞能分泌特异抗体，但不能长期培养，瘤细胞可以在体外长期培养，但不分泌特异抗体。于是Kohler和Milstein 1975将两种细胞杂交而创立了单克隆抗体技术，获1984年诺贝尔奖。



HAT: hypoxanthine, aminopterin, thymidine



几种模式生物



Caenorhabditis elegans

0.2 mm



Drosophila melanogaster



Arabidopsis thaliana

