



第一章

细 胞

学习目标

- (1) 能够说明细胞的演化过程、细胞生物学技术。
- (2) 能够说明真核细胞和原核细胞的区别，细胞骨架的分类和功能。
- (3) 能够叙述细胞膜基本的结构、细胞核主要功能和内质网、高尔基复合体、溶酶体、线粒体的结构和主要功能。
- (4) 能够叙述生物电现象的记录方法、静息电位和动作电位波形及其产生机制。

细胞是生命的基本功能单位，它被人们认识以后，细胞与细胞之间的关系、细胞发育的谱系、多细胞生物的细胞分化等神秘面纱被一一解开。科学家发现人体是 200 多种细胞巧妙搭配、协同作用的典范，机体内不同细胞相互协同，步调一致，是由于细胞间存在通讯；细胞的生长与分化、分泌、能量代谢等是因为细胞中存在着调节机制。这些现象对科学家们充满诱惑，驱使科学家们乐此不疲、无穷无尽地去探索。

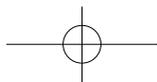
第一节 细胞的发现与研究

一、细胞生物学发展历程

1665 年，一位名叫罗伯特·胡克（Robert Hooke）的英国人，用自己磨制的镜片制成的显微镜观察软木薄片，他发现软木薄片中有大量像小屋的结构，他把这些小屋子称作**细胞（cell）**。尽管他所看到的像小屋的结构实际上是植物死细胞的细胞壁，但细胞这一名词被沿用了下来。后来，一位名叫列文·虎克（Antony van Leeuwenhoek）的荷兰人用其磨制的可以放大更高倍数镜片制成的显微镜观察一位不刷牙的老头的牙垢，他发现其中



第一章 细胞 -1 PPT





基础医学概论 (第2版)

有各式各样可以运动的小生物。1838—1839年,德国学者 M.J.Schleiden 和 T.Schwann 通过大量的观察和研究发现植物、动物都是由细胞组成的结构。在此基础上,他们建立了细胞学说,即细胞是生物结构和功能的基本单位,细胞的生老病死直接关系到生命,所以细胞研究是生命科学领域中最活跃的热点领域。细胞生物学的发展历程可分为以下几个阶段。

(一) 经典细胞学阶段

19世纪中叶,生物学家借助光学显微镜,对细胞的结构与功能进行了深入研究。在细胞研究过程中,除发现各种类型的细胞外,还找到了许多生物学问题的答案。这进一步促进了细胞学的快速发展。此阶段为经典细胞学发展阶段。

细胞是生命的基本功能单位被确定以后,随着研究的深入,细胞学研究需要相应的技术支持,19世纪后半叶,细胞研究技术逐渐发展起来,科学家逐步发明了细胞中的酶、核酸(DNA和RNA)、蛋白质、各种细胞器的定位和检测技术。细胞化学、组织化学成为细胞研究的重要手段。

(二) 细胞生物学发展阶段

20世纪50~70年代是以分子遗传学为主的分子生物学形成和发展时期。1953年,J.D.Watson和F.Crick在细胞学、遗传学和生物化学有关研究成果的基础上,根据通过X射线衍射技术获得的数据,提出了DNA双螺旋结构模型,初步揭示了生物的遗传物质复制的分子机制,奠定了分子生物学的基础。其后mRNA、核酸聚合酶、基因结构及基因表达调控、生物遗传中心法则等被逐一揭示。20世纪60年代初,M.W.Nirenberg、J.H.Matthaei等通过研究核糖核酸发现了各种氨基酸的密码。在其推动下,1965年,科学家们正式提出并创立一个从分子水平研究细胞生命现象的学科——细胞生物学。

随着人类基因组计划的完成,持续数百年的生物还原论研究基本完成。细胞生物学将进一步深入研究核酸、蛋白质和其他生物大分子的三维结构和功能,即进入细胞生物学后基因组学时代,它将遗传学、生物化学、分子生物学和细胞生物学的研究成果和相关知识进行整合,研究各种因素对细胞生命活动的影响。

未来的生物信息学也许能把生命现象较完整地模拟出来,不仅器官的功能,甚至生命个体的功能、发育、进化、灭绝等。可见细胞生物学的核心地位是多么重要,它将会在虚拟的生命世界中扮演重要角色。

二、细胞演化

(一) 生物的分类

1753年,瑞典科学家 Carl von Linné 将生物分为动物和植物两大基本类型,分类学上称之为界,即动物界、植物界,从而建立了一个严谨、方便的近代生物分类体系。细胞学研究成果支持这种分类方法,如动物细胞缺乏植物细胞所具有的细胞壁和色素。20世纪40~50年代,人们开始利用电子显微镜(以下简称电镜)观察生物,揭示了原核细胞与真核细胞之间的基本结构差异。按细胞结构复杂程度将细胞分为两类:简单型

的原核细胞和复杂型的真核细胞（表 1-1），由此奠定了现代生物基本分类的基础，即生物界由原核生物和真核生物两大部分组成。

表 1-1 原核细胞和真核细胞

项 目	原核细胞	真核细胞
典型细胞直径	1 μm	10~100 μm
典型染色体	单个环状 DNA 分子	多个线状 DNA 分子和基础性蛋白质
核膜	无	有
膜性细胞器	无	有
细胞骨架	无	有

原核细胞体积较小，除有些原核细胞具有类囊体外，生物膜仅局限存在于其表面（质膜），其内部基本是一个混杂的自由分子的乐园。遗传物质主要为单分子 DNA，染色体中无基础性蛋白质，如果有鞭毛的话，鞭毛是亚显微纤维型，不含 9+2 微管组结构，通常进行简单的二分裂增殖，分裂时无微管纺锤体，为简单型细胞。

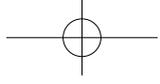
真核细胞具有相对大的体积，除表面的细胞膜外，还具有细胞内部的膜系统和细胞骨架结构，遗传物质较多，为多个线状 DNA 分子；染色体中含有规律存在的碱性蛋白质，具有高级螺旋结构，间期细胞具有核仁及核膜包围的核结构；胞浆内有线粒体、叶绿体等复杂的细胞器以及其他以膜为界的细胞器（如内质网、高尔基器等）；如果有鞭毛的话，为含 9+2 微管组结构型；通常二分裂增殖，分裂时有微管型纺锤体，为复杂型细胞（彩图 1-1）。

原核细胞与真核细胞不仅大小、结构、成分明显不同，在其他方面也有着巨大的差异。由原核细胞形成的生物称为原核生物，其基因结构中无内含子，胞浆中合成蛋白质的核糖体较小（70S）。原核生物均为单细胞或其群体，无典型性现象等；由真核细胞构成的生物称为真核生物，其基因结构中有内含子，即非编码 DNA 的插入片段，胞浆中核糖体较大（80S）。真核细胞可构成多细胞、多器官的机体，一般有典型性现象。

20 世纪 70 年代后期，美国学者 C.Woese 仔细分析了 200 余种原核和真核生物细胞中核糖体的 rRNA 寡核苷酸序列，发现一些适应特殊生态环境的原核生物，如产甲烷菌、嗜盐菌和热支原体与经典原核生物差异巨大，甚至比经典原核与真核细胞有关分子的差异还大。从 20 世纪 80 年代起，它们被确立为第三生命类型，并推测其可能较适应原始地球环境而称为古细菌。这形成了目前生物基本分类的新模式：生物可分为真细菌（Eubacteria）、古细菌（Archaeobacteria）和真核生物（Eukaryote）三个基本大类（表 1-2）。

表 1-2 三大类生物的细胞基本特征

分 类	真 细 菌	古 细 菌	真 核 生 物
细胞类型	真原核细胞	古原核细胞	真核细胞
核糖体	较小（70S）；16S rRNA 核苷酸序列具典型原核生物特点	较小（70S）；具特殊 16S rRNA 核苷酸序列	较大（80S）；具真核型 18S rRNA 分子
细胞壁（可无）	含肽聚糖	具醚酯成分	纤维素或甲壳素
基因组中基因	无内含子	可见内含子	有内含子



基础医学概论 (第2版)

细胞是生物的基本单位,生命现象是以细胞为舞台展现的,但细胞并不是生命现象的最小载体,一些无细胞结构的亚显微性分子体系也有生命遗传现象,典型代表就是19世纪末发现的活细胞内寄生的病毒。它们无细胞结构,基本成分为蛋白质壳和一种核酸(RNA或DNA),虽无独立生命特征,但对易感细胞有感染性并可借助宿主细胞的成分(如酶等)复制出新个体。类似的可承载、展现生命遗传现象的自然分子体系到20世纪末已发现了数类,某些种类甚至简单到仅含蛋白质或核酸。它们在生物学和医学、农学领域有着重要的意义,故也常被视为生命类型,被称为非细胞生命类。目前已发现的非细胞生命现象载体有朊粒、类病毒、拟病毒、RNA病毒、DNA病毒、反转录病毒以及质粒等(表1-3)。

表 1-3 非细胞生命载体主要类型

名称	基本组成成分	寄生或感染的宿主	主要生物学意义
朊粒	蛋白质	易感动物细胞	海绵状脑病的病原体
类病毒	RNA	易感植物细胞	病原体
拟病毒	RNA 和非自身编码的辅助蛋白质壳	易感原核或真核细胞	帮凶病原体
RNA 病毒	RNA 和自身编码的病毒蛋白质壳(可有外膜)	易感原核或真核细胞	病原体
DNA 病毒	DNA 和自身编码的病毒蛋白质壳(可有外膜)	易感原核或真核细胞	病原体
反转录病毒	含反转录酶的特殊 RNA 或 DNA 病毒	易感真核细胞	病原体
质粒	DNA	易感细菌	细菌遗传变异

尽管大部分非细胞生命类(除质粒外)在现代生物分类系统中常归为独特的一大类[附于生物分类三域(古菌域、细菌域、真核生物域)之外单独处理],但这只是为了描述方便,实际上非细胞生命之间(甚至同类不同成员间)的关系可能远不如其与各自宿主细胞间的关系密切。此类生命类型的严格寄生性/共生性表明它们并非前细胞生命类型,一般认为现存的非细胞生命是由某些细胞或细胞成分在长期寄生生活中丧失了大量结构与组分而演化形成的个体,是次生性生命现象的载体。

(二) 细胞的诞生

生命起源的核心问题是遗传系统起源问题。这个谜团在20世纪80年代初,随着美国学者 Cech 发现 RNA 可以像蛋白质一样具有生物催化功能而逐渐打破。目前认为生命起源最初阶段的遗传物质是 RNA,其分子兼有信息存储和催化加工功能,可能形成了最初的类似遗传传递自我复制的 RNA 世界。当今人们在实验室里,可以部分模拟这一过程。RNA 世界可能扩展吸收了其他成员,如用氨基酸或多肽构建结构复杂的蛋白质,蛋白质进一步延伸了它的催化功能;另一方面其遗传信息存储地位被化学上更稳定的 DNA 分子分享并替代,从而开创了生命的新格局:形成了分工更合理的由 DNA、RNA、蛋白质构成的多极世界,为更复杂的生命分子体系的形成奠定了基础。有人认为前细胞的化学进化阶段的分子体系可能与某些非细胞生命类型的结构/功能模式有可

比性,如类病毒、RNA病毒、RNA反转录病毒、DNA病毒等均可能反映化学进化阶段生命模式或环节的类似轮廓。

(三) 细胞的演化

生物间存在着巨大的差异,但也存在着一些共性,如它们均有细胞结构,并以DNA为其遗传物质,具有基本类似的生命机制等。这说明不管是以单细胞形式独立生活的生物,还是集不同功能细胞于一体的复杂生物,它们均来自同一共同的祖先。

今天的细胞均是高度进化的产物,最小的细胞的平均直径仅100nm,最大的细胞的平均直径则可达10cm。而生物则更加复杂,生物分类涉及5个界,100多个门。生物包括真核生物和原核生物,真核生物约有170万种,真核生物占已知生物的99%以上,但已发现和命名的生物只是冰山的一角,自然界存在的生物种数可能要超过命名种的几倍到几十倍。

三、细胞生物学技术概述

(一) 显微技术

在17世纪显微镜出现以前,人们无法用肉眼直接看到细胞和微生物。随着光学显微镜、电子显微镜、X线衍射技术、隧道扫描显微术等的出现,人类观测水平已达纳米级,生物科学研究已达到分子水平,这大大加快了现代生命科学的研究进程。

1. 光学显微观察技术

正常人眼的分辨率约为 $100\mu\text{m}$ 。光学显微镜(简称光镜)的分辨率约为200nm,它是投射光线的波长(照明光线波长 R 值等于 0.61λ)与镜头数值孔径(一般小于1.5)的商,这使得应用可见光(λ 约为400~650nm之间)照明的显微镜最多仅能清晰看到200nm以上的物体。

普通光学显微镜因物体在明亮背景上呈暗像,故被称为明视野显微镜。由于空气中透镜的数值孔径不大于1,物镜的最大放大倍数只能达到40左右,在物体与物镜之间加入比空气折光系数大的无色液体(与玻璃折光系数接近的浸油),可允许应用100倍的物镜,如结合10倍目镜的应用,明视野显微镜可提供倍率为1000的实际放大像。由于分辨率的限制,进一步提高放大倍率意义不大。它们多用于固定染色生物样本的观察。

荧光显微技术是用一种荧光物质直接或通过抗体间接附着生物样品上,荧光物质吸收激发光发出紫外线后发出可见光,所发光的颜色与所采用的荧光物质有关。如荧光素吸收495nm波长的紫外线后发出波长525nm黄绿色的可见光。此技术采用汞弧灯发出紫外光,滤光片系统使紫外光投射在样品上,荧光或可见光进入目镜被观察到。荧光显微镜除可研究被荧光染色的成分分布外,也可直接观察生物样品中天然荧光物质,如叶绿素。

20世纪80年代,在荧光显微镜基础上加装激光扫描设备发展出激光扫描共焦显微镜,其光源改为单色激光束,由载物台的步进马达变换聚焦面及平移,对标本内的不



基础医学概论 (第2版)

同聚焦平面的各点进行逐层扫描,由检测器逐点收集被激发的荧光图像,通过计算机图像三维重组形成样品的立体结构图像。

2. 电子显微观察技术

电子波像光线一样可以聚焦,只是应用环形电磁线圈而非玻璃透镜,电子的波长是可见光波长的 100000 分之一,在电子显微镜(简称电镜)中,电子冲击在荧光屏上使图像显示或使照相底版曝光。应用透射电子显微镜时,为使不超过 100nm 的样品有足够的支撑强度来承受高度真空条件下的电子束轰击,需将样品固定在一个小铜网上进行观察。应用磷钨酸进行负染后可以直接看到样品的细微结构,此技术使样品在背景中被突显出来。另一种技术是在样品表面覆盖一层铂或者其他贵重金属薄膜:重金属雾以约 45° 角的方向喷溅在样品上,并形成投射阴影,此技术特别适用于样品表面结构的研究,可以获得物体的立体图像。此外,可用与免疫荧光技术类似的方式进行免疫标记,用电子显微镜观察,只不过此时所用的抗体是用高电子密度的黄金微粒标记而不是用荧光染料标记。

3. 扫描探针显微观察技术

20 世纪 80 年代,基于探测超导隧道效应,科研人员研发了新型扫描探针显微镜(scanning probe microscopy, SPM)技术,分子结构研究有了新的手段。这种技术利用一个十分尖细的探针在样品表面做扫描运动,可直接观测细胞器的表面结构细节。目前,扫描探针显微技术通过制作不同类型的探针,除测量样品与探针间电子隧道效应外,也可测量其他特性,如原子力、磁力等。应用有关技术,已在探索分子结构的某些细节方面取得了较大进展。

(二) 分离纯化技术

为了深入了解细胞的组成和功能,需对细胞成分及有关分子进行分离、纯化、分析。分离纯化生物大分子、细胞器可应用多种分离技术,较常见的有以下几类。

1. 物理分离

(1) 沉淀法:常见有盐析法、有机溶剂沉淀法,多用于蛋白质粗提。盐析所得的蛋白质絮凝物,可溶解成溶液;有机溶剂沉淀法得到的新鲜沉淀,如及时洗去有机溶剂,也可溶解成溶液,但时间一长,可致蛋白质变性。

(2) 过滤法:利用多孔性阻挡层或筛从流体(气体或液体)中分离固体物质的方法。利用不同孔径的滤层,可分离或滤除流体中的一些固体成分,如空气和血清除菌等,在电镜发明前,通过过滤技术分离发现病毒。

(3) 电泳法:带电颗粒在电场中向其所带电荷相反的电极移动为电泳;在电场中一般使蛋白质带负电荷,向正极移动,由于蛋白质所带电荷数量不同,向正极移动的速度也不同,以及分子量大小不同,移动速度不同,可将不同的蛋白质分离开。

(4) 离心法:常用于分离细胞、细胞组分或较大的分子等。离心分离是利用重力作用把悬浮在液体内的颗粒分离。在离心场中由于旋转使生物匀浆受到了向心力(人工重力)作用,其中向心加速度($r\omega^2$)相当于重力加速度,如加快转速,其值可加大,如每分钟 3000 转时,半径(r)为 10cm,此处向心加速度约为重力加速度的 1000 倍;

习惯上则称 1000g，并用其表示离心强度。在一定条件下离心颗粒按大小及与液体密度差异发生移动的速度不同，通常以**沉降系数 (sedimentation coefficient, S)**来表示，一般类似结构的细胞组分或分子较大的组分，S 值也较大，如 80 S 的真核生物核糖体比 70 S 的原核生物核糖体大。

具体分离细胞成分也可采用将样品放入预先制备的具有密度梯度的溶液中离心，使大小颗粒分别在不同密度区带集中。

2. 色谱 (层析) 技术

现代色谱技术类型很多：按流动相可分为气相色谱和液相色谱等；按吸附剂形式可分为柱色谱、纸色谱和薄层色谱等；按吸附力可分为吸附谱、分配色谱、离子交换色谱和凝胶渗透色谱等；还有按进样方法或终止方法的分类。

气相色谱对很多中小分子化合物分离较理想，但溶质必须有适当的挥发度；中等大小的分子可用液相色谱；更大的分子用凝胶过滤或凝胶渗透色谱，实际为不完全筛。柱色谱有最高的分辨能力，常用葡聚糖、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等制备柱体；但纸色谱和薄层色谱方法速度快、成本低，也常用。

带离子基团物质的分离可用离子交换色谱法，常用有离子交换纤维素、离子交换葡聚糖等。分离抗原或抗体也可用亲和色谱法，常用葡聚糖、琼脂糖凝胶、戊二醛等交联抗体或抗原。

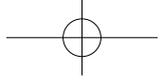
3. 细胞标记技术

活细胞标记方法可用于载体细胞监测研究。

(1) 外源性标记基因转染：应用基因重组方法将外源性报道基因和特定的载体连接并导入细胞，该报道基因在细胞中表达的蛋白质具有特殊的生物化学或物理特性，可用于检测。目前，常用的报道基因有**绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)**、**增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)** 基因、 **β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)** 基因。其中来自水母 GFP 基因的绿色荧光蛋白和增强绿色荧光蛋白，被紫外光和蓝光激发后，能发出绿色荧光，其效果最好，不需要底物或辅因子，可对活体检测，该成果获得 2008 年度诺贝尔化学奖。

(2) 荧光染料标记：利用一些能发荧光的物质共价结合或物理吸附在细胞或分子的某个基团上，利用它的荧光特性来检测细胞或分子的相关信息。该方法在示踪研究中有非常重要的地位，但存在假阳性标记的问题。目前，常用的亲脂性碳花青染料有 PKH26 和 DiI，另外，还有 DAPI 和 BrdU。BrdU 主要用来标记分裂细胞。此外，放射性同位素、铁纳米颗粒也可用于干细胞标记。

(3) **流式细胞术 (flow cytometry)**：流式细胞术是分选和检测细胞的技术，可用于非染色细胞样品细胞器的分离，并测定其大小等；对染色细胞样品，则可进行**细胞分选 (cell sorting)**、成分分析。通常待测样品，可以是细胞、染色体、细菌等，采用荧光染料附染后，使其成单列排列的样品流，通过入射激光和可检测激发荧光的装置测定特定样品的信号，当样品通过高压偏转板时，路径会发生分歧，因而可分别收集、分选。目前，用流式细胞仪可快速测定荧光、光吸收及散射、电阻等变化，可多参数测量分析样品的体积、DNA、蛋白质、特殊分子的含量及活性。



(三) 分子检测技术

1. 核酸分子检测技术

近年来,分子生物学技术发展迅猛。核酸检测技术以其样品微量、大规模、高通量的优势,广泛应用于生物研究的各个领域。在此仅简介一些核酸分子检测基础技术。

(1) **DNA 测序技术 (DNA sequencing)** 的基本原理:对待测的 DNA 片段一端进行保护并予以标记、分组,而另一端分别随机终止于特定的一种(或两种)残基上,每一组产物都是已知特定残基结尾的寡核苷酸的混合物。然后在可以区分长度仅相差一个核苷酸的不同 DNA 分子的前提下,对各组寡核苷酸进行电泳分析,只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶若干个相邻的泳道中,即可从凝胶的放射自显影片比较中直接读出 DNA 上的核苷酸顺序。如利用荧光染料标记替代放射性标记,电泳后用激光扫描,使不同的核苷酸发不同的荧光,可机读分析,自动测定。

DNA 化学降解法的基本步骤为:①采用放射性同位素 ^{32}P 标记 DNA 的一端;②四组 DNA 链分别进行特定碱基的化学修饰;③采用化学法使 DNA 链在修饰位置断链;④采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法将 DNA 链按长短分开;⑤放射自显影显示区带,直接读出 DNA 的核苷酸序列。

脱氧链终止法:采用相同的 DNA 片段(作为模板)、相同的引物以及 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 四种脱氧核苷酸,平行进行四组反应,每组分别加入一种 ddATP、ddGTP、ddCTP 和 ddTTP 双脱氧核苷酸进行反应,使双脱氧核苷酸随机地接入 DNA 链中,因双脱氧核苷酸 3' 碳位脱氧,当双脱氧核苷酸接入 DNA 尾端时,无法继续连接下一个核苷酸,使 DNA 链合成终止,分别产生具有特定残基结尾的、不同长短的四组 DNA 链。这四组 DNA 链再经过聚丙烯酰胺凝胶电泳,按链的长短分离开,用放射自显影显示区带,根据碱基配对情况,就可直接读出被测 DNA 的核苷酸序列。

(2) **核酸杂交技术**:核酸杂交的原理是利用同源 DNA 单链在复性的过程中按照碱基互补原则可成双链的特性,使两个不同来源的 DNA 单链杂交在一起。

分子杂交:不同来源的核酸变性后,只要这些核酸分子的核苷酸序列含有可以形成碱基互补配对的片段,就可合并在一处复性,形成所谓的杂化双链,这个过程称为**杂交 (hybridization)**。杂交可以发生于 DNA 与 DNA 之间, RNA 与 RNA 之间,也可以发生于 DNA 与 RNA 之间。核酸杂交反应是一对一的反应,其敏感度主要取决于标记探针的质量和杂交后的检测方法。在优化的条件下,核酸杂交可检测到 pg 水平的靶分子。常用技术有以下两类:

用探针技术 (probe technique) 制备一段可与待测核酸序列互补的寡核苷酸序列并进行标记,制成探针,再与待测单链核酸杂交,在排除未杂交的探针后,标记信号就可显示待测序列。

核酸印迹杂交可分为 **DNA 印迹杂交 (Southern blot hybridization)**、**RNA 印迹杂交 (Northern blot hybridization)**、**斑点印迹 (dot blot)** 杂交等。杂交可在支持膜上、切片上或液相中进行,如原位 (in situ) 杂交和液相杂交等。

DNA 印迹杂交技术由美国分子生物学家 E. M. Southern 在 1975 年创立, 因而用他的名字 Southern 命名。此项技术是用凝胶电泳分离经限制性内切酶消化的 DNA 片段, 再用相应的探针杂交。检测到明确特异性序列的 DNA 片段。

基因芯片 (DNA chip) 技术: 它是一种同步、高通量集成的原位杂交, 把已知的不同序列的 DNA 探针有序地固化在同一支持物表面, 与待测核酸样品进行分子杂交, 然后检测分析杂交信号。此法可对大量样品进行平行、高效、快捷的基因分析。样品通常需纯化、扩增和荧光标记。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是利用 DNA 聚合酶催化反复进行同一 DNA 片段的合成, 特异性地增加同一 DNA 片段的技术。

反应时需要以目标 DNA 片段或由 RNA 用反转录酶反转录合成的 cDNA 作为模板, 以 DNA 聚合酶和四种脱氧核糖核苷酸 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 作为原料。由于半保留复制有方向性 ($5' \rightarrow 3'$), 故还需制备与待扩增 DNA 片段的两端互补的引物, 以便启动双向的 DNA 合成。

聚合酶链式反应可使微量的 DNA 得到扩增, 可用于检测或合成特定的 DNA 分子。此技术有重大实用价值, 相关技术发展很快, 现已拓展出很多新技术, 以适应各种实验的需要。因此, Mullis 获得了 1993 年度的诺贝尔化学奖。

(3) 蛋白质检测技术: 除采用经典的细胞化学技术进行蛋白质检测外, 还可用免疫学技术对蛋白质进行定性、定量、定位检测。其原理是抗原与抗体可进行非共价键的可逆结合, 抗原表位 (决定簇) 和抗体分子可变区互补构型, 使两分子间有较强的亲和力。利用它们在体外彼此特异结合的特性, 可应用已知抗体或抗原对样品中的待测抗原或抗体进行检测。

(4) 蛋白质与核酸相互作用的检测技术: 检测蛋白质与核酸相互作用, 常用 DNA 足迹法、DNA 亲和色谱法或电泳动力漂移试验。采用标记的 DNA 与相关蛋白质反应, 观察其结合情况。

DNA 足迹法 (DNA foot printing) 是检测蛋白质与核酸相互作用的技术, 原核 RNA 聚合酶与 DNA 启动子的结合位点就是用该方法探明的。它标记 DNA 片段的一端并将其分为两组, 其中一组与结合蛋白混合, 另一组为对照组, 然后都用 DNA 酶消化, 并进行电泳分离; 由于蛋白结合的 DNA 部分被保护可免于水解, 混合蛋白质组的消化片段少于对照组, 通过电泳丢失的区带可确定蛋白质结合序列 (位点)。

电泳动力漂移试验 (electrophoretic mobility shift assay): 此试验准备过程与足迹法一样, 也是将一端标记的 DNA 片段分为两组, 其中一组与可结合特异性 DNA 序列的蛋白质混合, 另一组为对照组; 但不进行酶消化, 而直接进行非变性电泳。因蛋白质结合于 DNA, 将使电泳位置发生变化 (漂移), 与未结合的 DNA 电泳区带比较, 可明确区分。此试验可用于分析 DNA 片段中是否有功能序列 (元件, 如启动子、增强子等)。

DNA 亲和色谱法 (DNA-affinity chromatography): 在一根玻璃柱中充填交联已知序列 DNA 寡核苷酸的小球, 用色谱法分离细胞或蛋白质悬液。其中能与该 DNA 寡核苷酸结合的蛋白质滞留在分离柱内, 其他的蛋白质被洗脱, 然后可用高盐缓冲液洗柱, 使结合的蛋白质脱结合而洗出。此法可用于分离纯化细胞内与特定核酸序列相互作用



的蛋白质分子(如转录因子)。

(四) 糖的检测技术

由于单糖有多种支链连接方式,使得多糖结构远比蛋白质、核酸复杂。在现代细胞学中,细胞膜表面的糖成分在细胞与细胞、细胞与基质联系识别及信号通信中有重要作用,故检测糖残基有重要的生理及病理学意义。凝集素是主要的天然可识别结合糖成分的蛋白质分子,因它们的相互作用可导致细胞凝集,类似抗体与颗粒性抗原作用形成的凝集现象而得名。

最近已开发一些新技术,较突出的是糖芯片:将寡糖分子固定于聚苯乙烯微量滴定板上制成糖芯片,用带有荧光的标志物追踪凝集素与糖的结合,可以高效、系统、高通量分析、检测蛋白质与糖的相互作用。

第二节 细胞基本结构

细胞是由生物膜包裹着一些原生质的小体,它是生物体生命活动和生长发育的基本结构单位。不同种类的细胞大小差别很大,形态也各不相同。最小的细胞是支原体(*mycoplasma*),其直径约为 $0.1\sim 0.2\mu\text{m}$,需要借助于电镜方可观察到;最大的细胞是鸵鸟的卵,直径可达 10cm 。细胞的形态和大小虽然差别很大,但基本结构相似。从基本结构上可将其分为两大类,即原核细胞(*prokaryotic cell*)和真核细胞(*eukaryotic cell*)。

原核细胞结构简单,细胞内原生质分化少,没有细胞核膜,遗传物质散落在胞浆中;真核细胞内部结构较复杂,在光镜下可见细胞膜、细胞质和细胞核。在电子显微镜下,除了可见细胞膜外,还可见到其内部有多种由膜性结构组成的重要的亚显微结构。因此,电镜将细胞结构分为膜相结构(*membranous structure*)和非膜相结构(*non-membranous structure*)。膜相结构主要包括细胞膜、内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体和核膜等,非膜相结构主要包括核糖体、中心体、染色质、核仁、微管和微丝等。

一、细胞表面

(一) 生物膜与细胞膜

1. 生物膜

生物膜(*biomembrane*)是细胞内两个不同区域或细胞与环境之间的屏障。在电镜下各类膜系统均具有相似的结构,可呈现典型的三层结构,即两个电子密度高的致密外层,各厚约 2nm ,中间夹的电子密度低的浅色层,平均厚约 3.5nm ,三层结构的厚度约 7.5nm ,习惯上将这三层结构称为单位膜(*unit membrane*)。虽然各种生物膜的厚度、组成、功能不完全相同,但都是在单位膜的基础上形成的结构。通常将构成细胞外层的界膜,称为细胞膜,而把包围各种细胞器的膜,如内质网膜、高尔基复合体膜、溶