

第三章

细胞生物学实验技术



METHODS AND TECHNIQUES

完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

本章内容提要

- 第一节 显微技术
- 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

第一节 显微技术

- 光学显微镜：以可见光（或紫外线）为光源。
- 电子显微镜：以电子束为光源。

一、光学显微镜

（一）普通光学显微镜

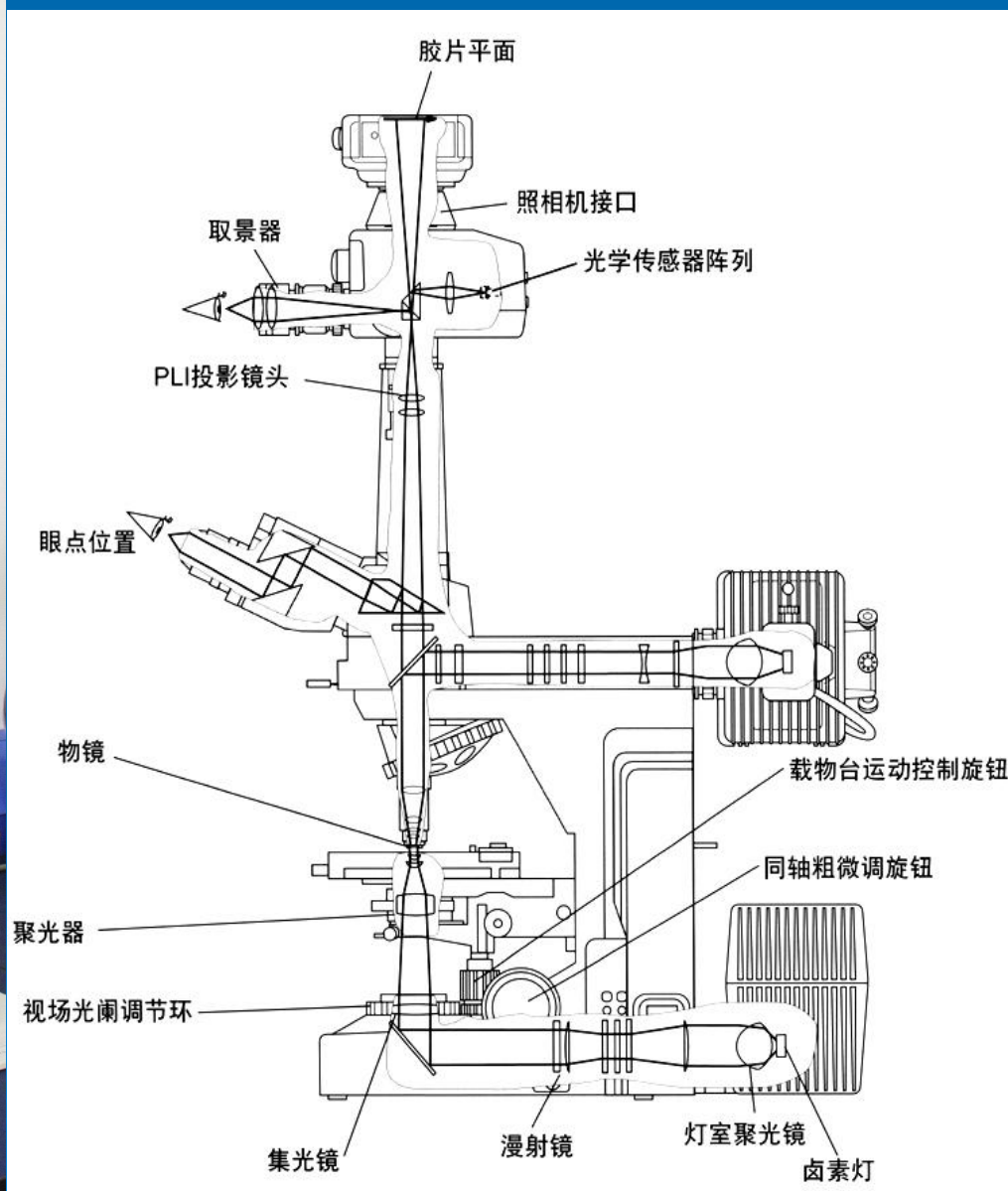
➤ 1. 构成：

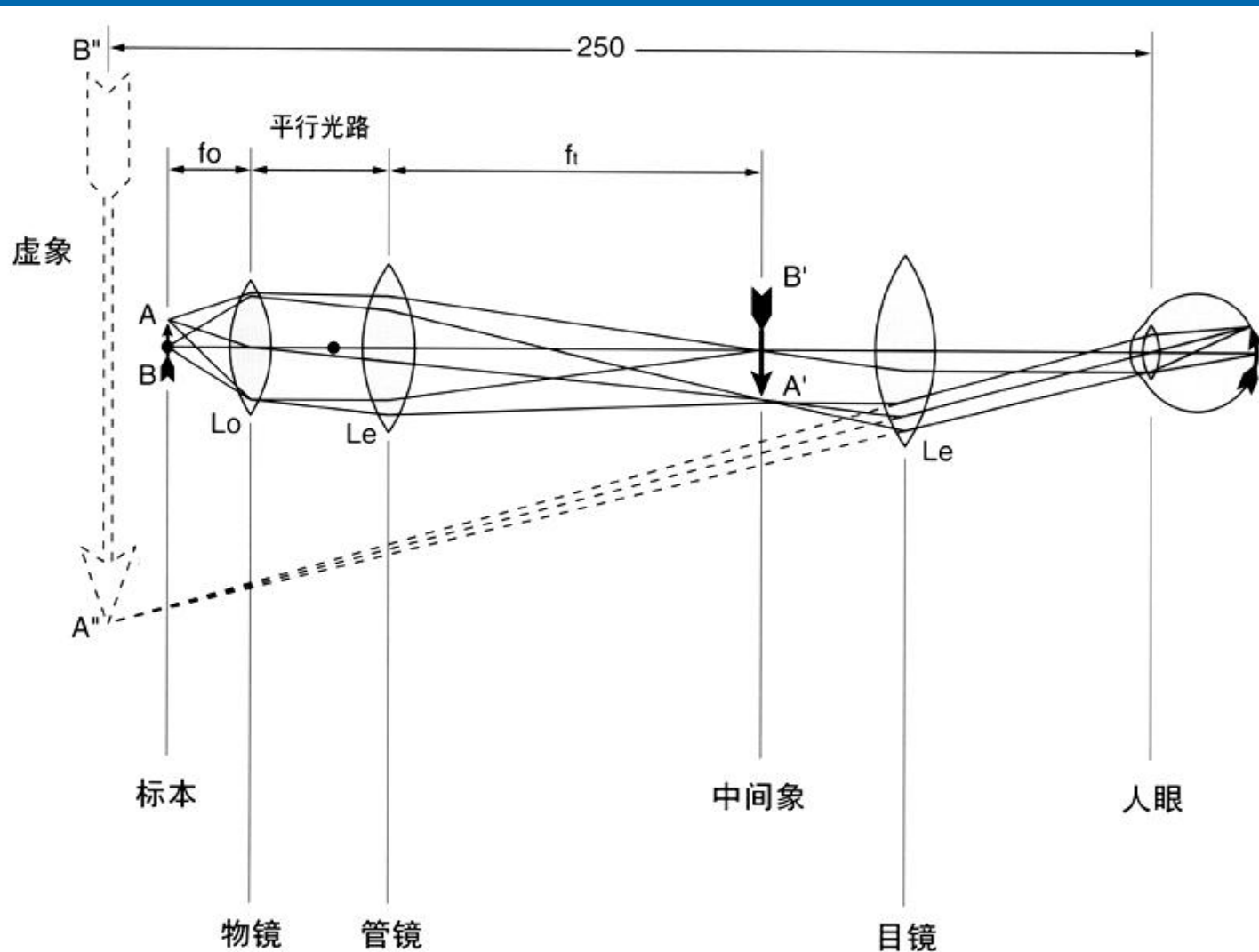
➤ ①照明系统

➤ ②光学放大系统

➤ ③机械装置

➤ 2. 原理：经物镜形成倒立实像，经目镜进一步放大成像。





$$M_o = f_t / f_o$$

M_o : 代表物镜放大倍数

f_t : 代表管镜焦距

f_o : 代表物镜焦距

➤ **3. 分辨力：指分辨物体最小间隔的能力。**

➤ **$R=0.61\lambda/NA$ 。**

- 其中 λ 为入射光线波长； NA 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

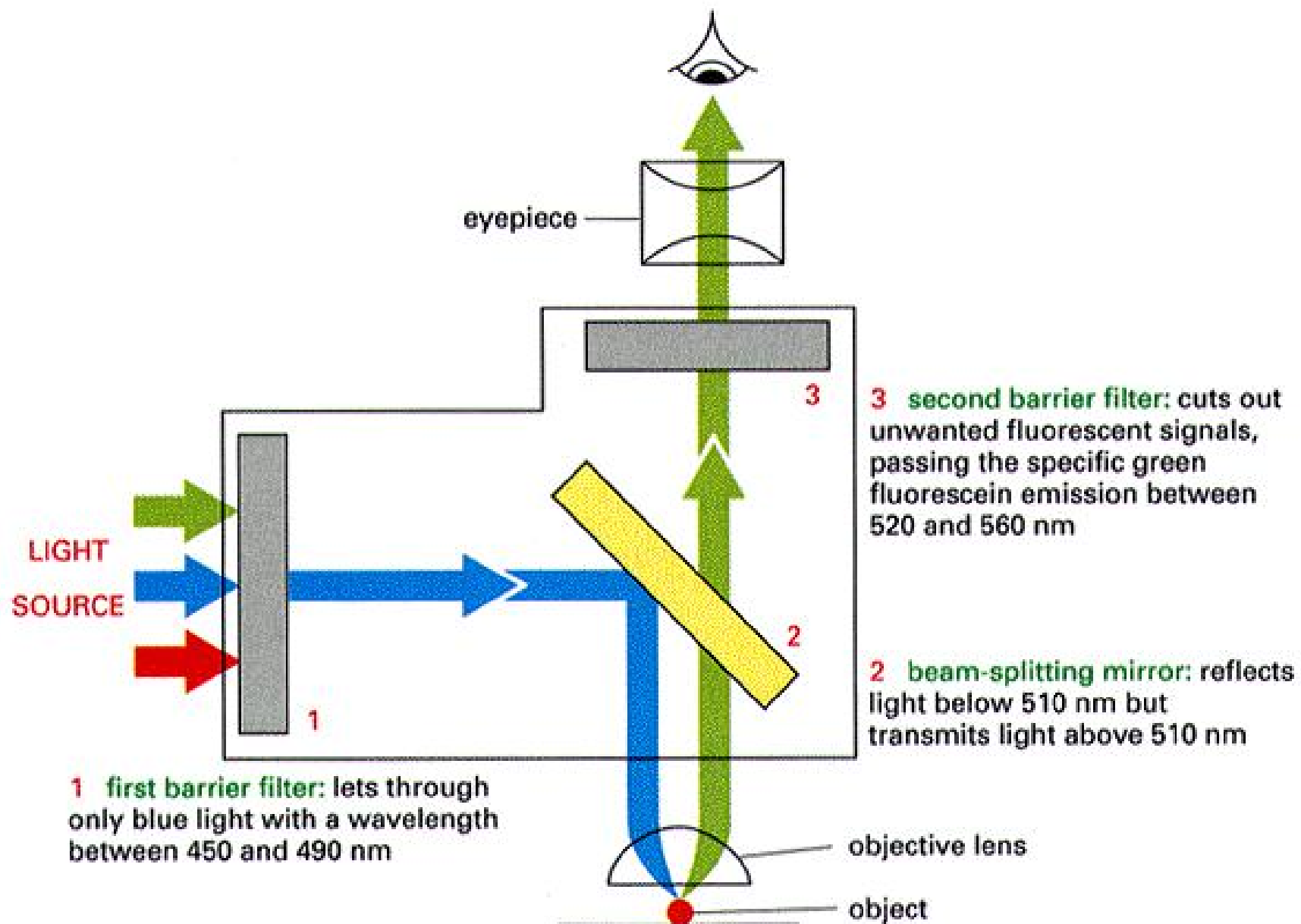
➤ 显微镜的几个光学特点：

- 制作光学镜头所用的玻璃折射率为**1.65~1.78**，所用介质的折射率越接近玻璃的越好。
- **$\sin \alpha / 2$** 的最大值必然小于**1**；介质为空气，镜口率一般为**0.05~0.95**；油镜头用香柏油为介质，镜口率可接近**1.5**。
- 普通光线的波长为**400~700nm**，分辨力数值不会小于**0.2 μ m**，人眼的分辨力为**0.2mm**，因此显微镜的最大设计倍数为**1000X**。

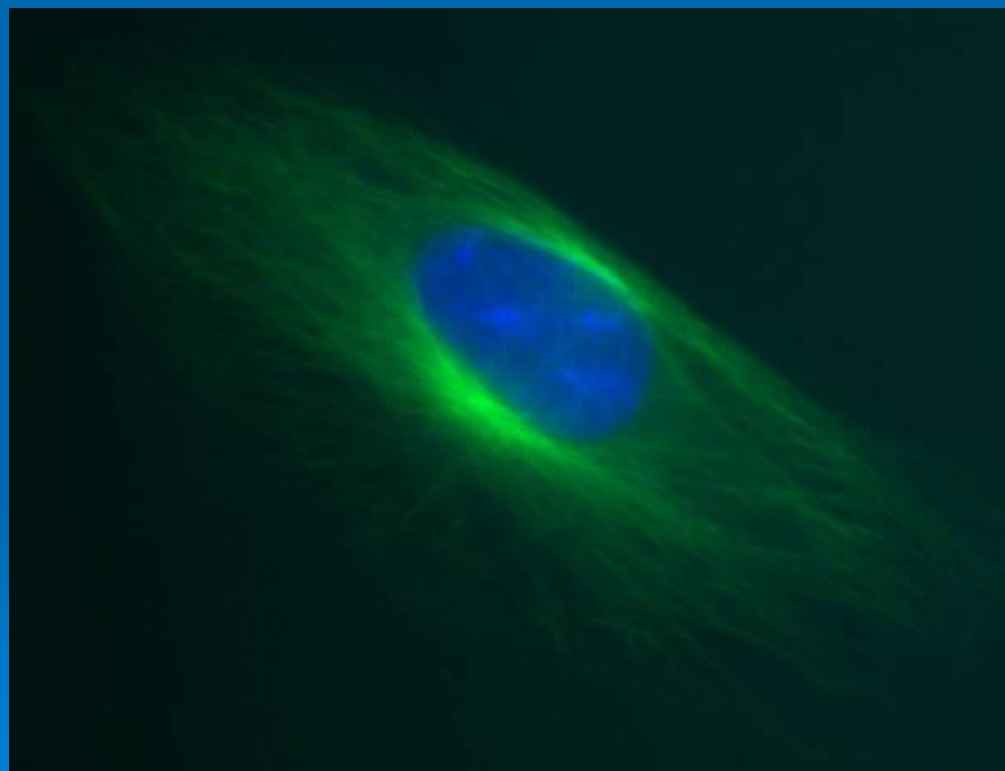
(二) 荧光显微镜 Fluorescence microscope

- 特点：光源为紫外线，波长较短，分辨力高于普通显微镜；
- 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 of epithelial cell,

DNA in blue and Microtubules in green

（三）激光共聚焦扫描显微境

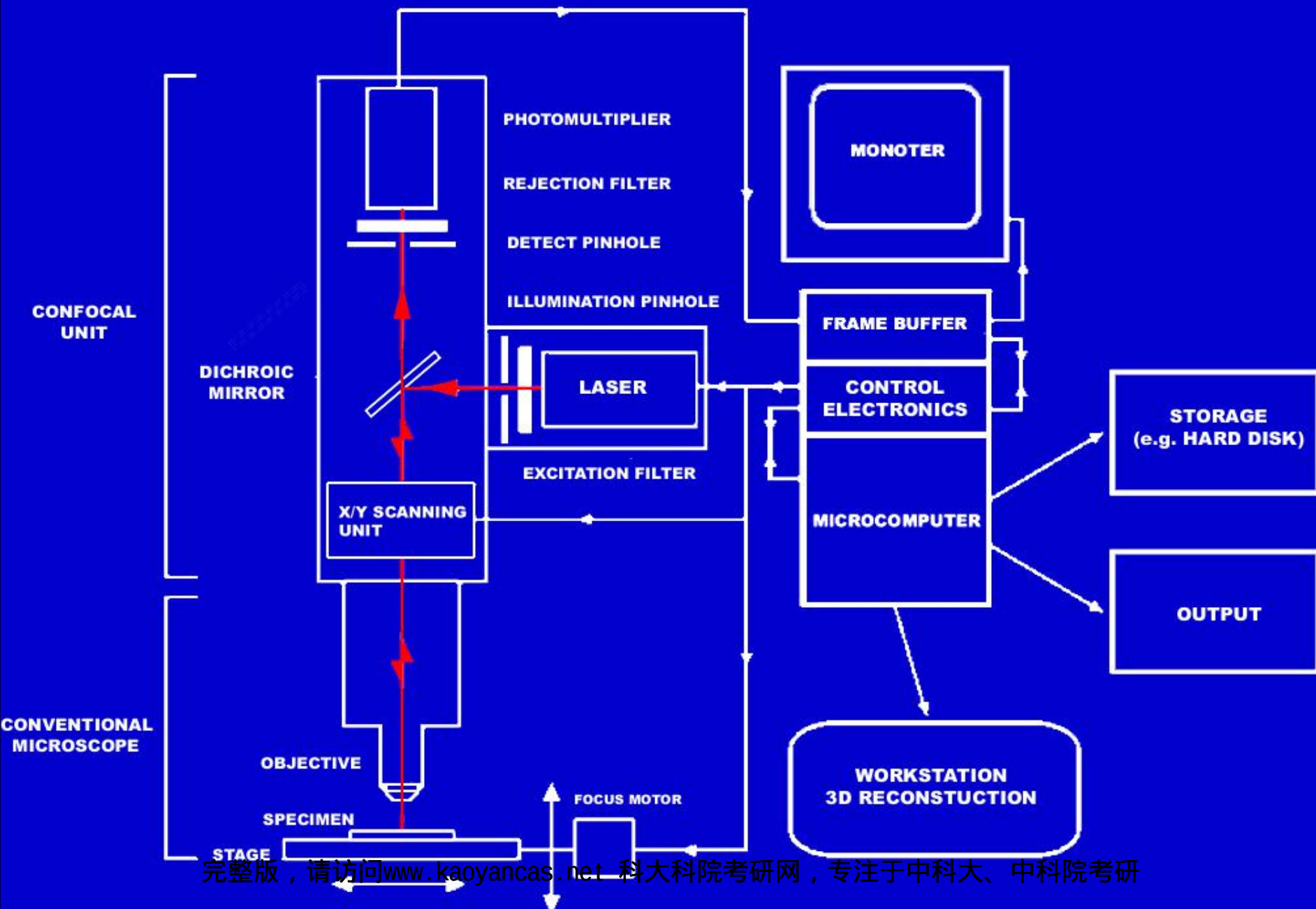
Laser confocal scanning microscope, LCSM

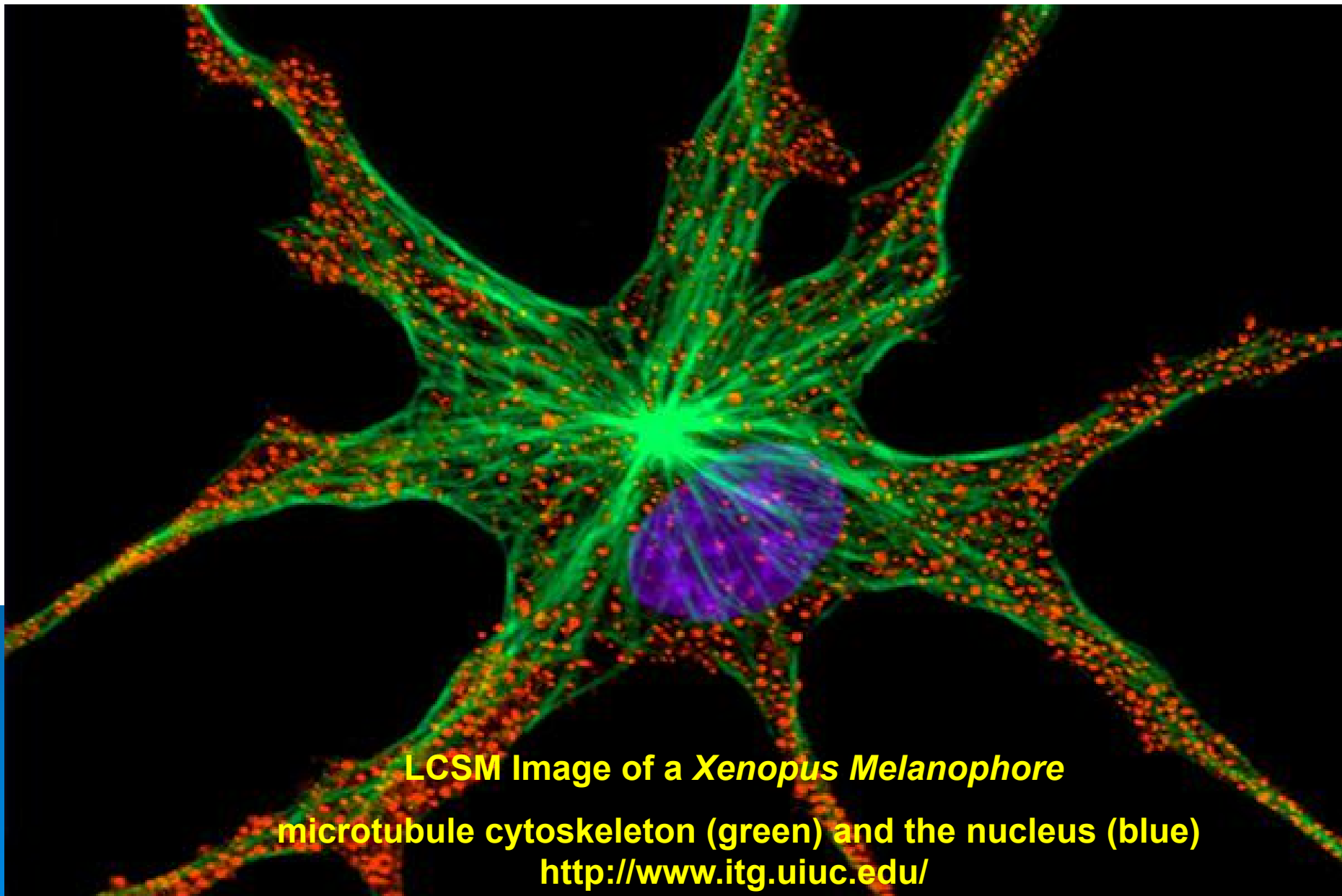
- 用激光作光源，逐点、逐行、逐面快速扫描。
- 能显示细胞样品的立体结构。
- 分辨力是普通光学显微镜的**3**倍。
- 用途类似荧光显微镜，但能扫描不同层次，形成立体图像。

laser confocal scanning microscope, LCSM



LASER COMFOCAL SCANNING MICROSCOPE

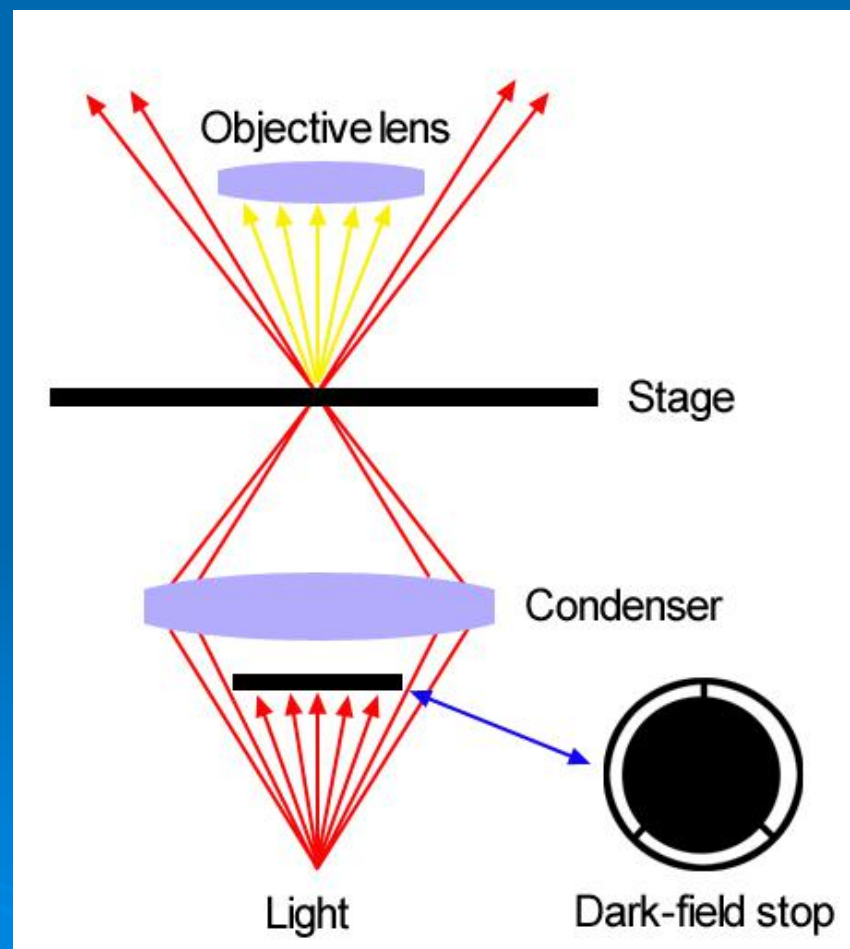




LCSM Image of a *Xenopus Melanophore*
microtubule cytoskeleton (green) and the nucleus (blue)
<http://www.itg.uiuc.edu/>

（四）暗视野显微镜 dark field microscope

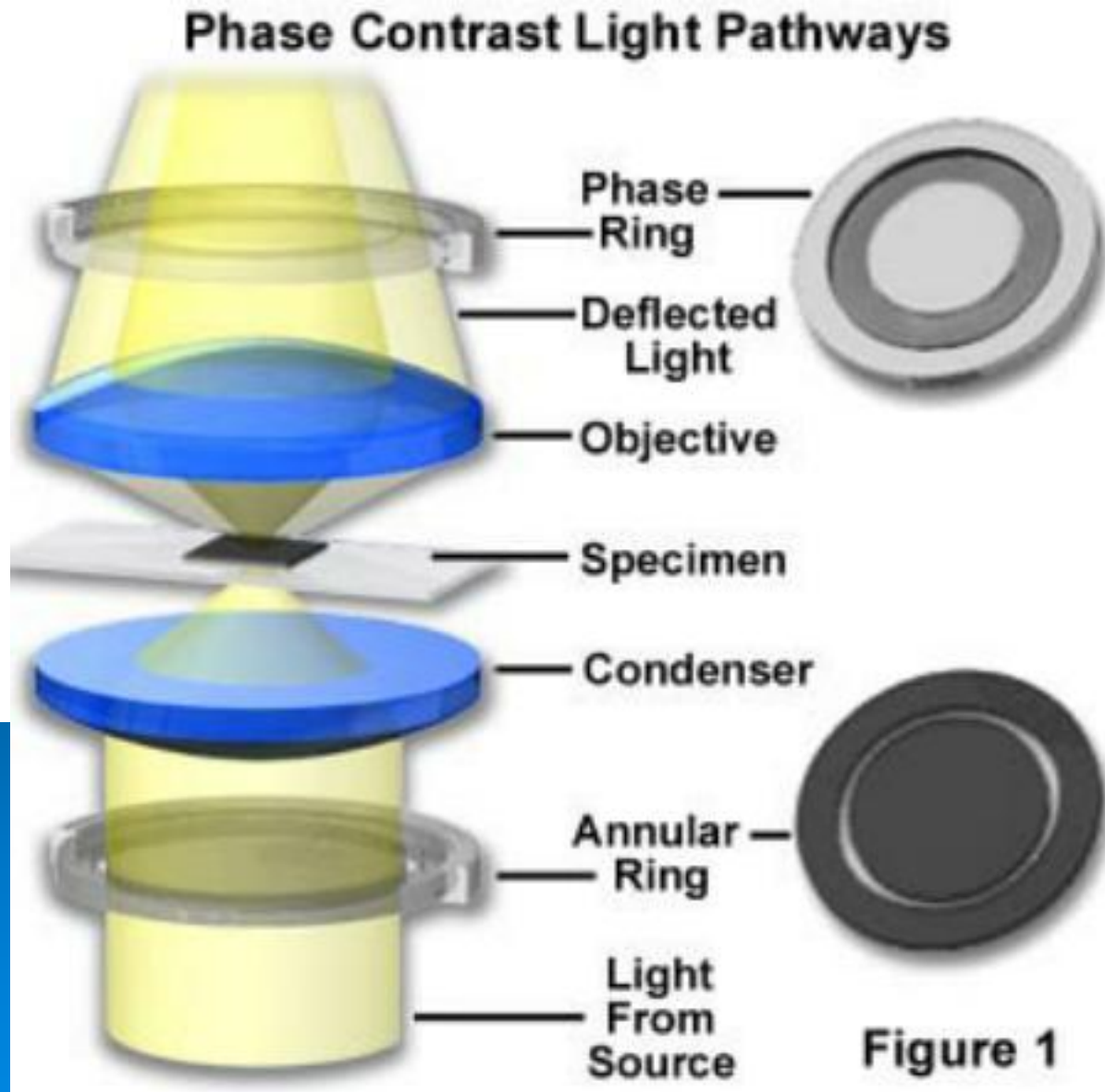
- 聚光镜中央有挡光片，照明光线不直接进入物镜，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的。
- 可观察 4~200nm 的微粒子，分辨率比普通显微镜高50倍。



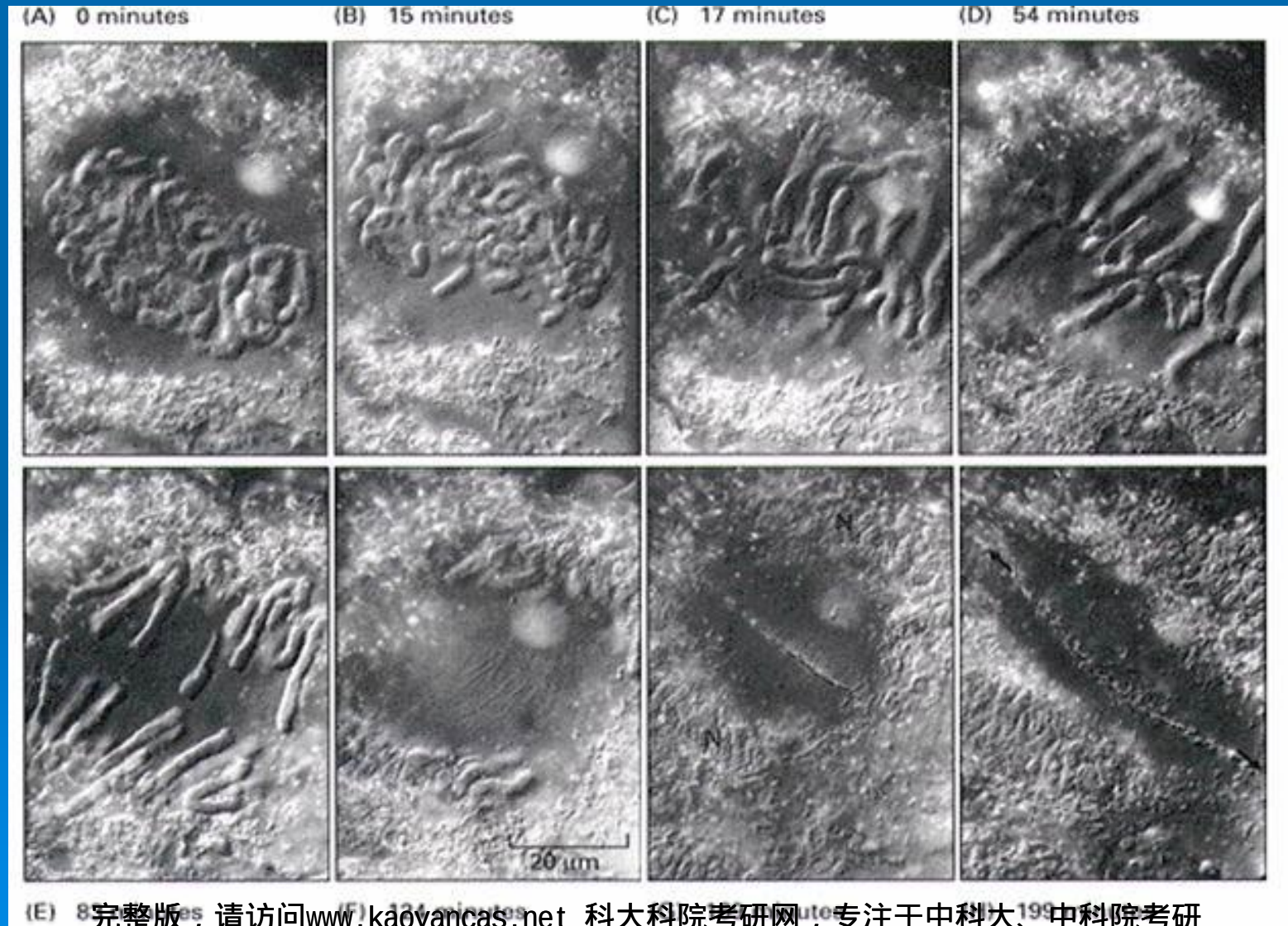
（五）相差显微镜

- 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

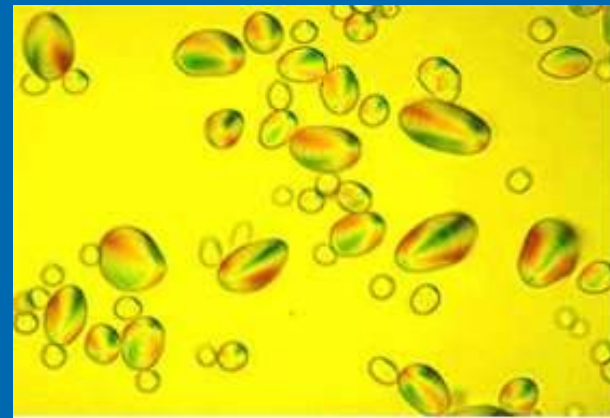


用途：观察未经染色的玻片标本



（六）偏光显微镜polarizing microscope

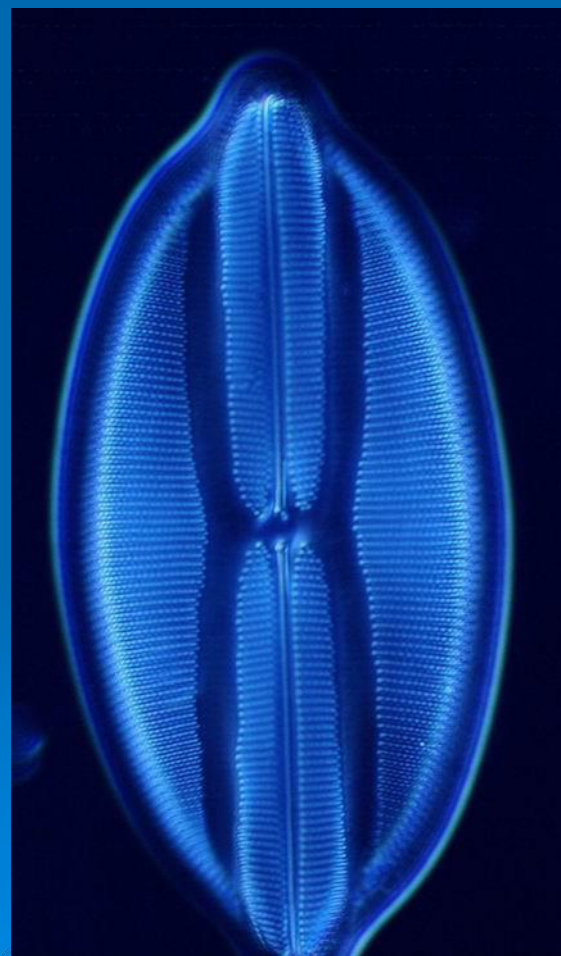
- 用于检测具有双折射性的物质，如纤维丝、纺锤体、胶原、染色体等。
- 光源前有偏振片（起偏器），使进入显微镜的光线为偏振光，镜筒中有检偏器（与起偏器方向垂直的偏振片）。
- 载物台是可以旋转。



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，前者在载物台之下，后者在载物台之上，用于观察培养的活细胞，通常具有相差物镜，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，集普通光镜加相差、荧光、暗视野、DIC、摄影装置于一体。
- 自动化与电子化。



二、电子显微镜

（一）扫描电子显微镜

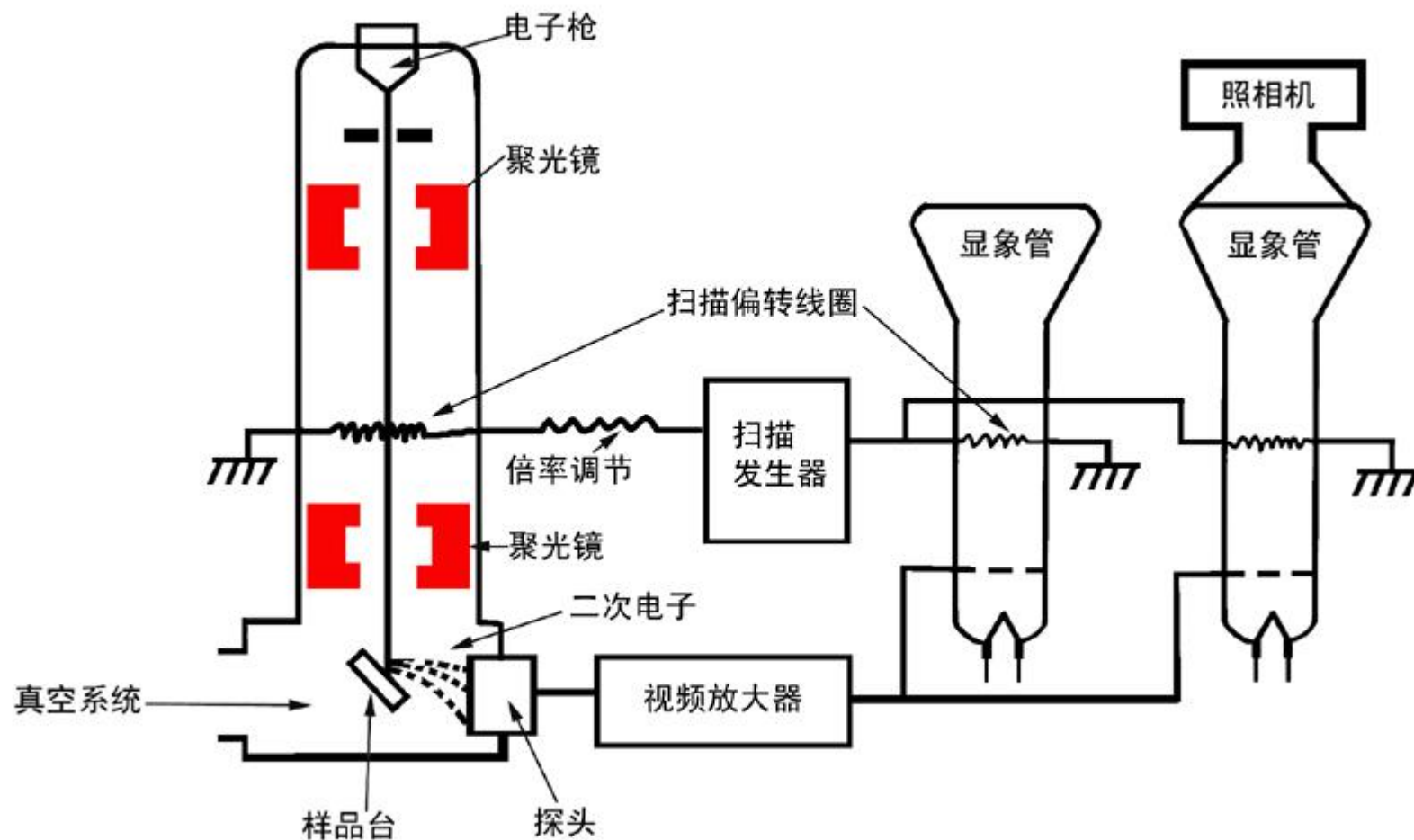
- 1、作用：观察标本表面结构。（20世纪60年代）
- 2、分辨力：为6~10nm，由于人眼的分辨力（区别荧光屏上距离最近两个光点的能力）为0.2mm，扫描电镜的有效放大倍率为 $0.2\text{mm}/10\text{nm}=20000\text{X}$ 。

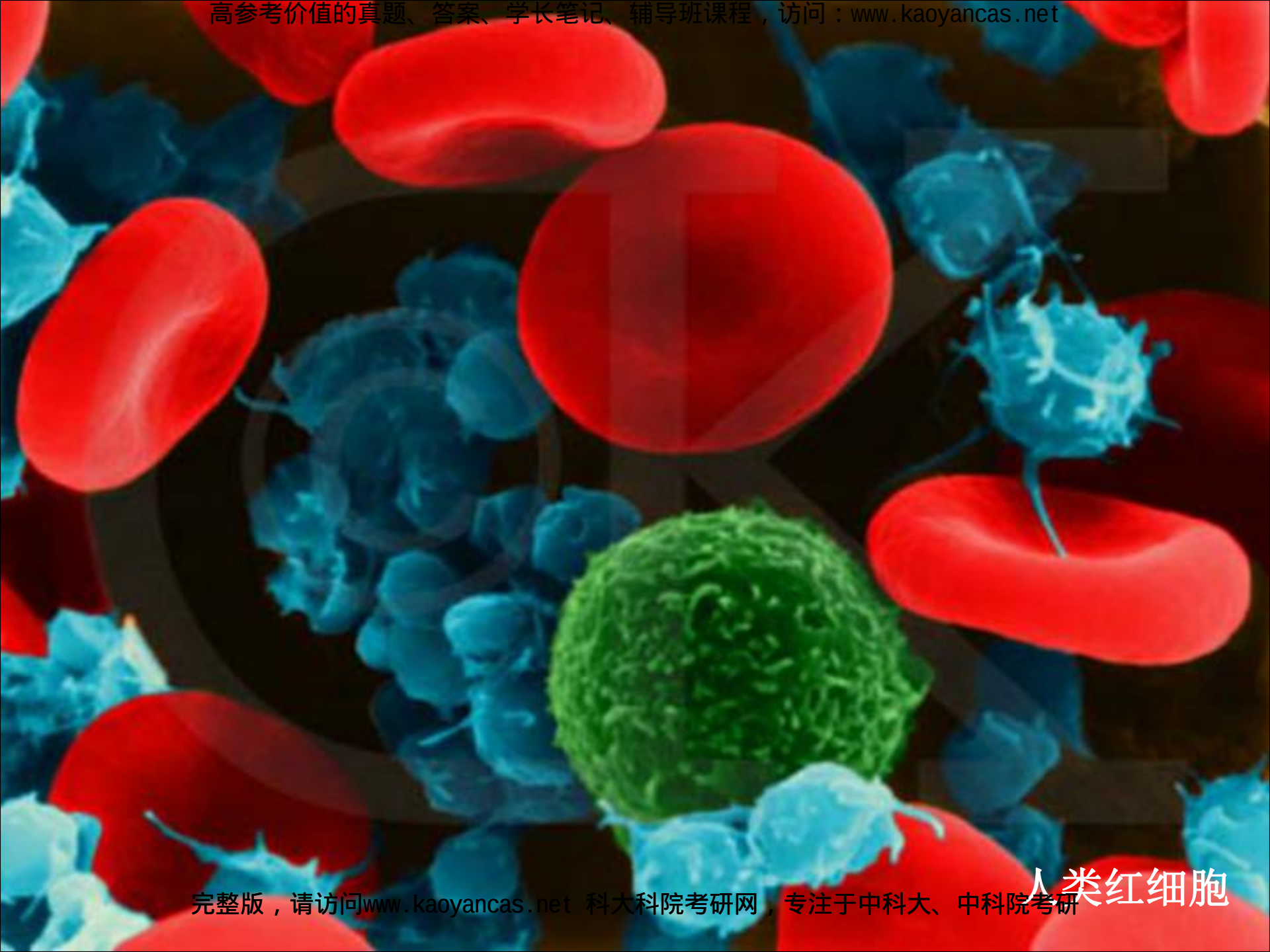
Scanning electron microscope (SEM)



- **3、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。）

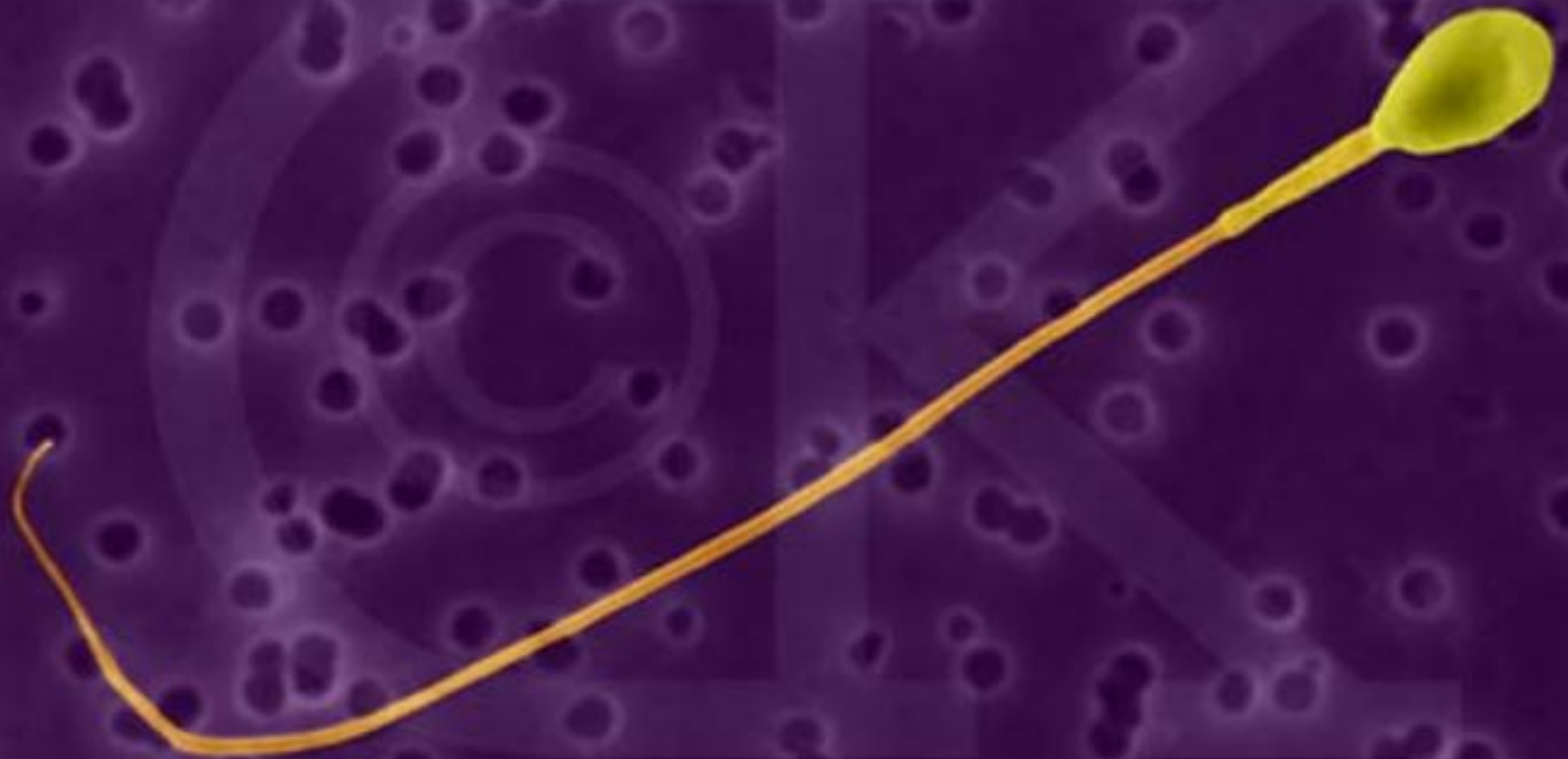
扫描电子显微镜原理







酵母



人类精子

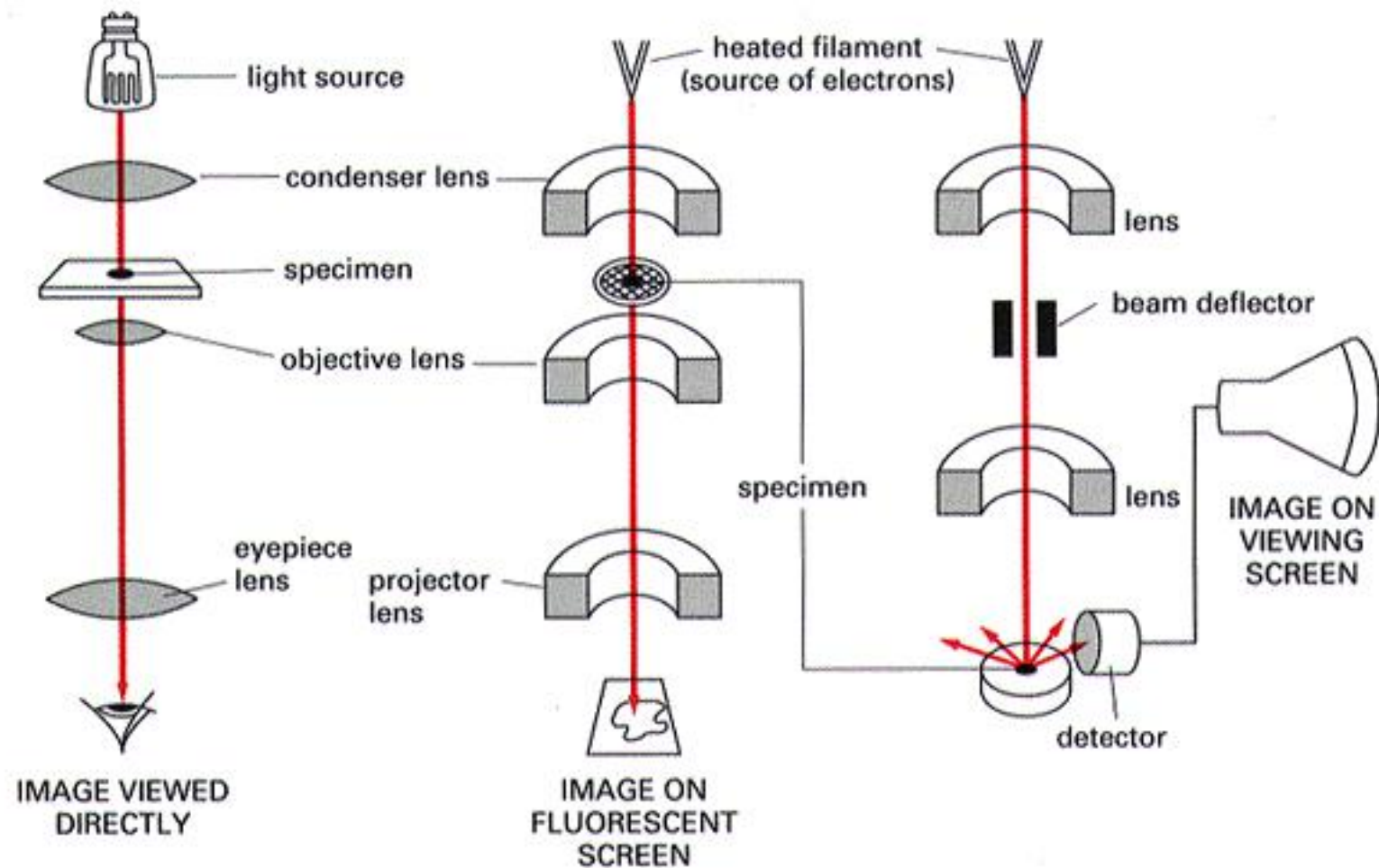
完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

➤ （二）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。电子束的波长短，并且波长与加速电压(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（ultrastructure），即小于0.2 μ m、光学显微镜下无法看清的结构，又称亚显微结构（submicroscopic structures）。



**LIGHT
MICROSCOPE**

**TRANSMISSION
ELECTRON MICROSCOPE**

**SCANNING
ELECTRON MICROSCOPE**

透射电子显微镜

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE, TEM

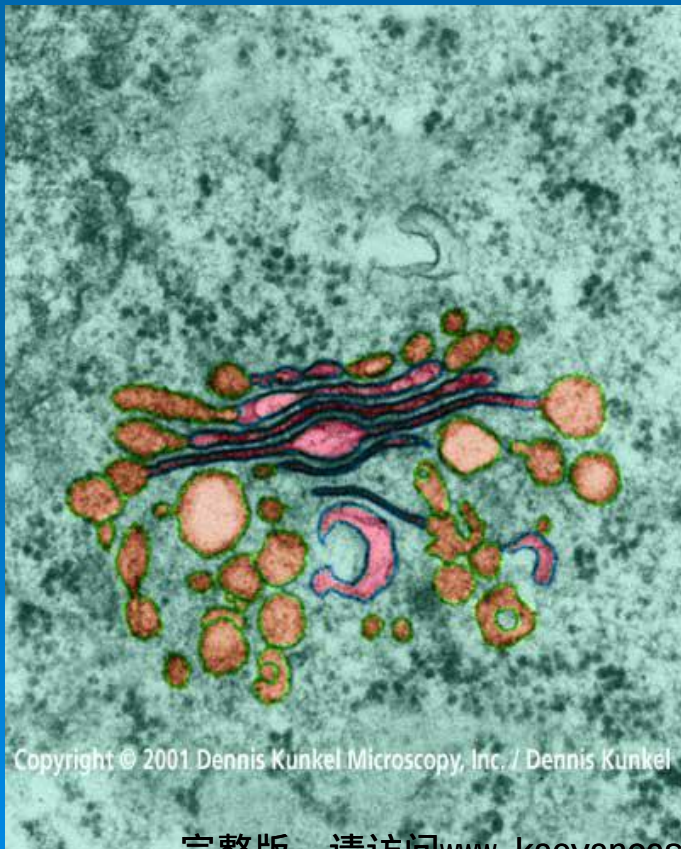


表. 不同光线的波长

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

2、制样技术

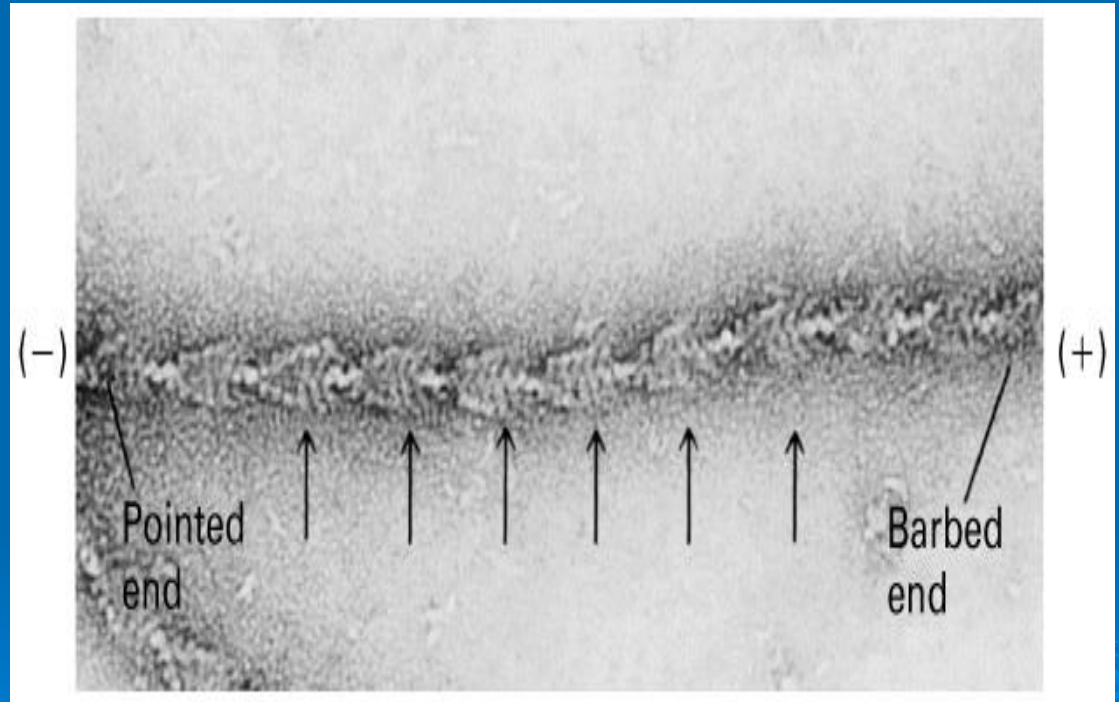
➤ 1) 超薄切片

- 电子束穿透力很弱，用于电镜观察的标本须制成厚度仅50nm的超薄切片，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

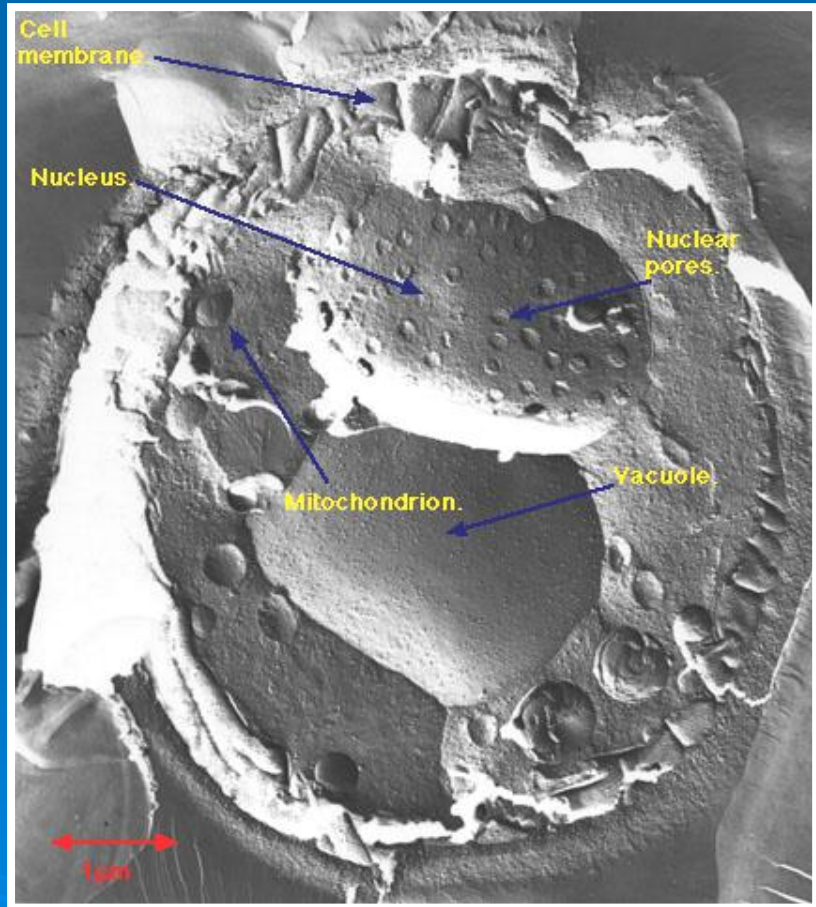
- 用重金属盐(如磷钨酸)对铺展在载网上的样品染色；吸去染料，干燥后，样品凹陷处铺了一层重金属盐，而凸出的地方没有染料沉积，从而出现负染效果，分辨力可达**1.5nm**左右。



Negative Stained Actin

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，暴露出了断面结构。向断裂面上喷涂一层蒸汽碳和铂。然后将组织溶掉，把碳和铂的膜剥下来，此膜即为复膜（**replica**）。



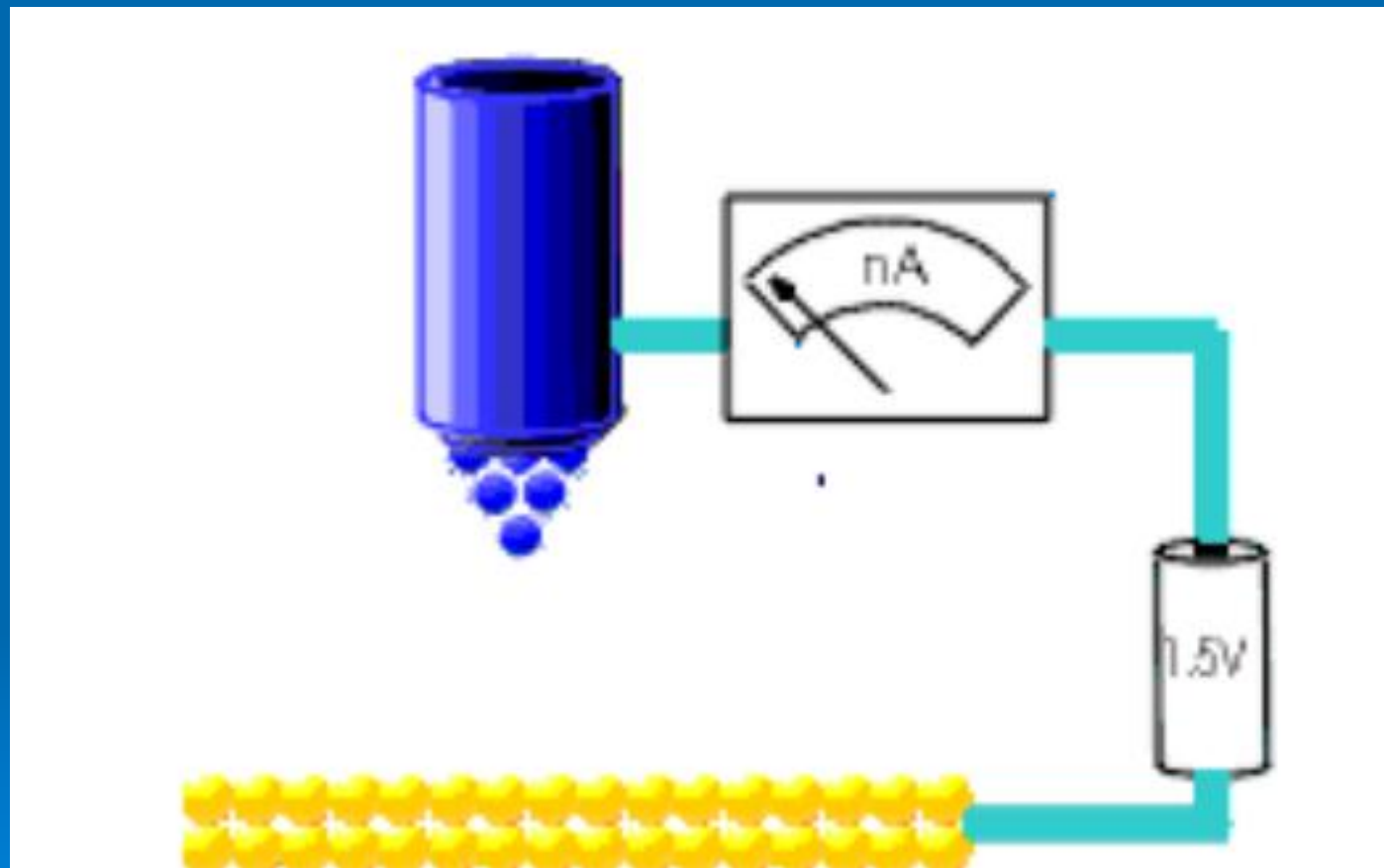
A Yeast Cell

（三）扫描隧道显微镜

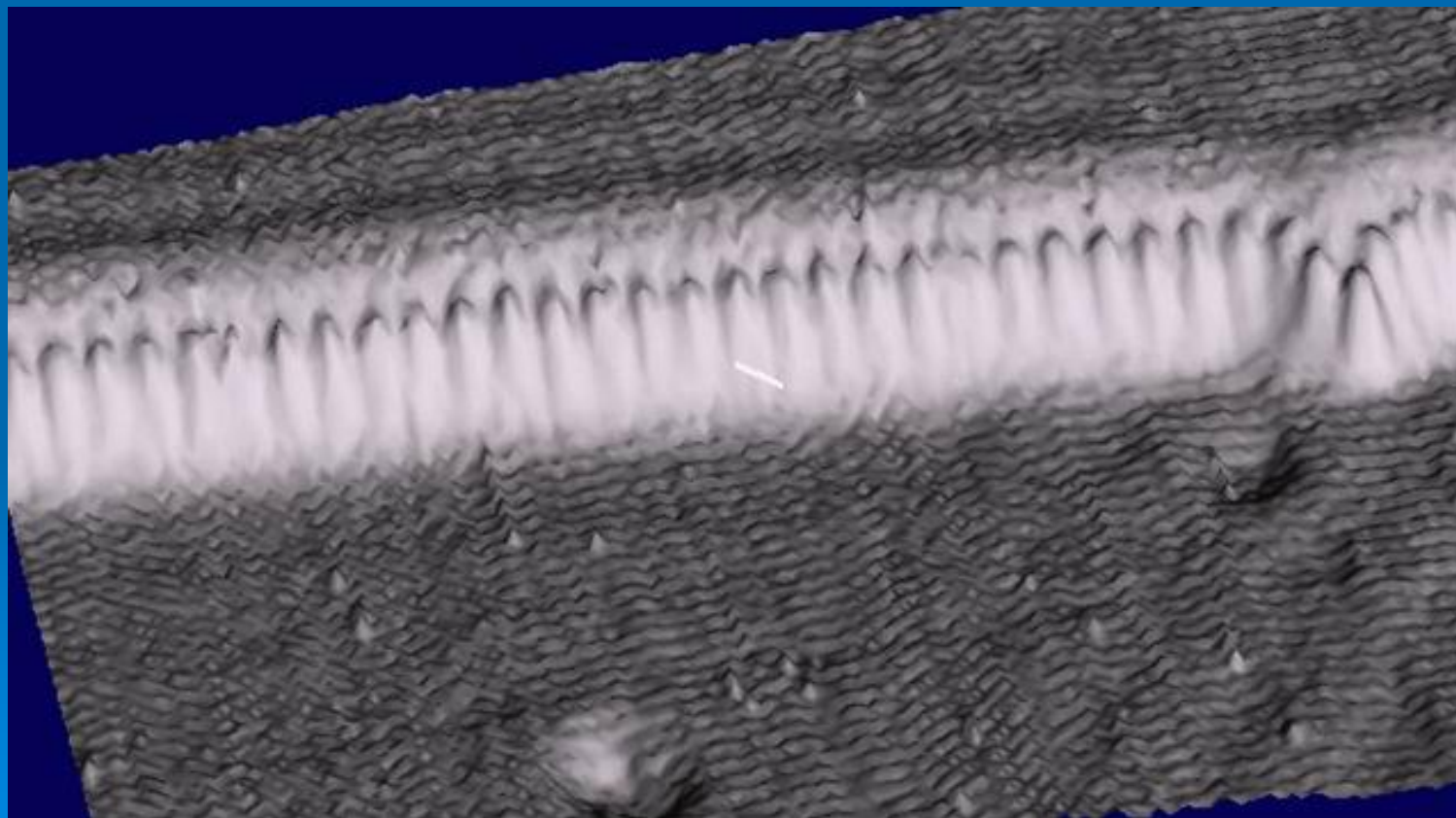
scanning tunneling microscope, STM

- **原理：**根据隧道效应而设计，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 **0.001nm** 。
- **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



STM image, Benzene molecules accumulate at step edges on Cu



三、显微操作技术

micromanipulation technique

- 显微操作技术包括细胞核移植、显微注射、嵌合体技术、胚胎移植以及显微切割等。
- 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。显微操作器是用以控制显微注射针在显微镜视野内移动的机械装置。
 - 细胞核移植技术已有几十年的历史，Gordon等人（1962）对非洲爪蟾进行核移植获得成功。我国著名学者童第周等上个世纪70年代在鱼类细胞核移植方面进行了许多工作，并取得了丰硕成果。



显微操作仪