

第三章

细胞生物学实验技术



METHODS AND TECHNIQUES

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（**histochemical and cytochemical staining method**）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：血膜空气快速干燥、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：细胞中的醛基可使**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**H₂O₂**。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

- 概念：根据免疫学原理，利用抗体同特定抗原专一结合，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）：常用的荧光素有异硫氰酸荧光素、罗丹明等。
- 酶标免疫法（enzyme-labeled antibody method）：常用的酶有辣根过氧化物酶，酶与底物发生反应后形成不透明的沉积物，从而显示出抗原存在的部位。

三、显微光谱分析技术

- 细胞中有一些成分具有特定的吸收光谱，核酸、蛋白质、细胞色素、维生素等都有自己特征性的吸收曲线。
- 可利用显微分光光度计对某些成分进行定位、定性和定量测定。

四、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。

五、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。最初是使用带放射性的**DNA**探针，后来又发明了免疫探针法。

（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

