

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材
国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供8年制及7年制（“5+3”一体化）临床医学等专业用

细胞生物学 实验指导

主 编 刘艳平

副主编 赵俊霞 项 荣 涂知明 刘晓颖

Medical services
foundation

Medical professional
attitude, behavior and ethics

Clinical Skills

MEDICAL
ELITE EDUCATION

Information management capacity

Critical thinking

Group health and health system

Communication skills

人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材
国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材
全国高等学校配套教材

供8年制及7年制(“5+3”一体化)临床医学等专业用

细胞生物学 实验指导

主 编 刘艳平
副主编 赵俊霞 项 荣 涂知明 刘晓颖
编 者 (按姓氏笔画排序)

王彦玲(河北医科大学)
刘 丽(河北医科大学)
刘艳平(中南大学生命科学学院)
刘晓颖(安徽医科大学生命科学学院)
闫小毅(浙江大学医学院)
李 杰(中南大学生命科学学院)
李 敏(浙江大学医学院)
陈 辉(郑州大学基础医学院)
吴茉莉(大连医科大学基础医学院)
张树冰(中南大学生命科学学院)

杨 娟(西安交通大学医学院)
郑 红(郑州大学基础医学院)
周叶方(中南大学生命科学学院)
周娜静(河北医科大学)
项 荣(中南大学生命科学学院)
封青川(郑州大学基础医学院)
赵俊霞(河北医科大学)
贺 颖(郑州大学基础医学院)
涂知明(华中科技大学生命科学与技术学院)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验指导 / 刘艳平主编. —北京: 人民卫生出版社, 2015

ISBN 978-7-117-21419-3

I. ①细… II. ①刘… III. ①细胞生物学 - 实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 239398 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

细胞生物学实验指导

主 编: 刘艳平

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 三河市潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 11 插页: 1

字 数: 282 千字

版 次: 2015 年 12 月第 1 版 2015 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-21419-3/R · 21420

定 价: 25.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

2014年3月,全国高等医药教材建设研究会和人民卫生出版社联合在北京召开了“全国高等学校八年制临床医学专业第三轮规划教材主编人会议”。此次会议确定第三轮修订在前一版的基础上进一步优化,在主干教材的基础上,配套编写“实验指导/实习指导”、“学习指导及习题集”。

本实验指导是根据“北京会议”精神,结合细胞生物学学科特点编写而成。本书共分为六篇,第一篇显微镜技术,含五个实验,主要从普通光学显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、电子显微镜、显微摄影介绍显微镜的使用和相关细胞结构的观察;第二篇细胞结构及成分的显示,含五个实验,主要介绍了光学显微镜下线粒体、中心体、液泡、核仁、DNA、RNA等结构和成分的观察;第三篇亚细胞结构的分离与鉴定,含两个实验,主要介绍了分离单个细胞及细胞内细胞核、线粒体、微粒体、脂蛋白等结构成分的方法;第四篇细胞培养,含三个实验,主要介绍了细胞的原代、传代培养技术和小鼠胚胎干细胞的培养方法、以及细胞的计数与显微测量的方法;第五篇细胞分子生物学和细胞遗传学技术,含四个实验,主要从细胞分子生物学的水平介绍了DNA、RNA、蛋白质的分析方法,从细胞遗传学的水平介绍了染色体的制备、观察及核型分析的方法;第六篇细胞功能实验,含九个实验,主要介绍了细胞运动、细胞骨架、细胞膜的功能、细胞增殖、细胞衰老与死亡、细胞周期和细胞分裂、细胞信号转导等细胞功能研究中常用的方法。每一个实验都由实验目的要求、实验用品、实验内容和方法、作业和思考题等部分构成,对实验原理、技术方法、相关试剂的配制及注意事项等都有详细地阐述;而且,每个大实验又由几个小实验组成,力求全面地将相关实验和技术融合在一起,如实验一中就包括了普通光学显微镜的使用、细胞形态的观察、临时玻片的制作等几个内容。使用学校可以根据课程教学内容、设备条件和教学时数等实际情况进行选择开设。

本书在编写过程中虽然力求完善,但由于作者水平有限,书中难免有不妥之处,敬请老师和同学们批评指正,以便进一步修改和完善。

刘艳平
2015年5月

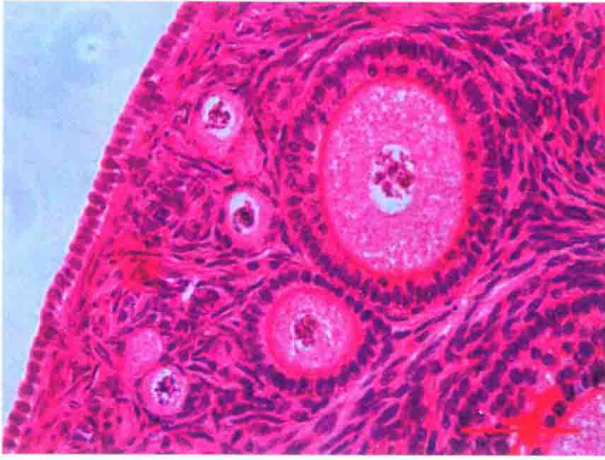


图1-1 兔卵巢部分结构示意图

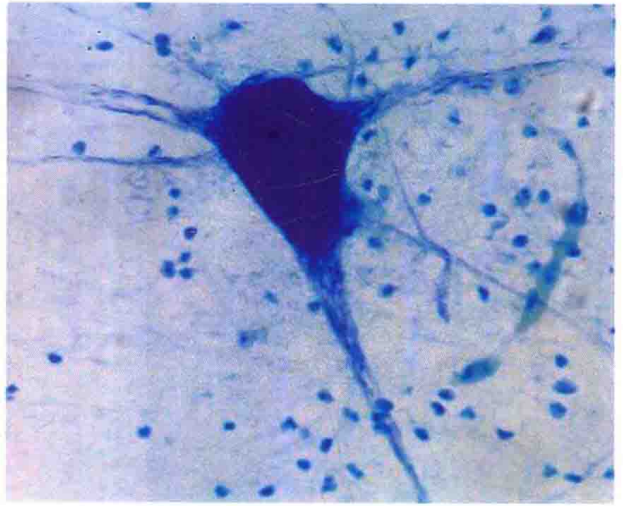


图1-2 猪神经细胞图

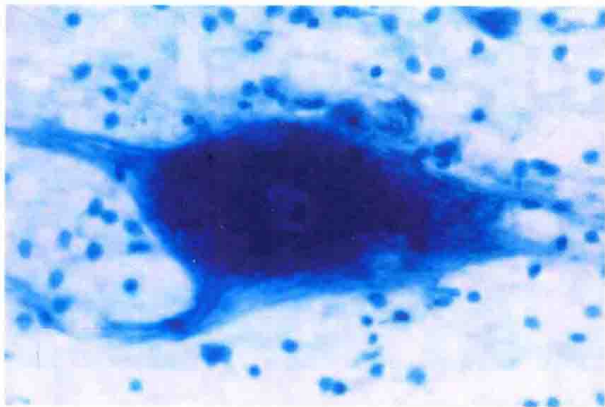


图5-2 动物的神经细胞

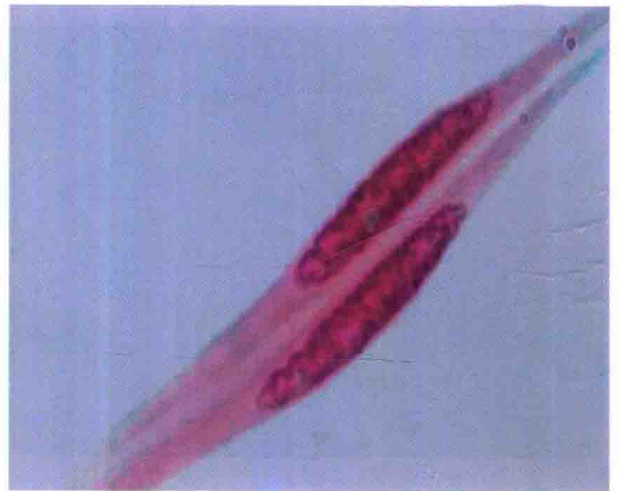


图5-3 动物的平滑肌细胞

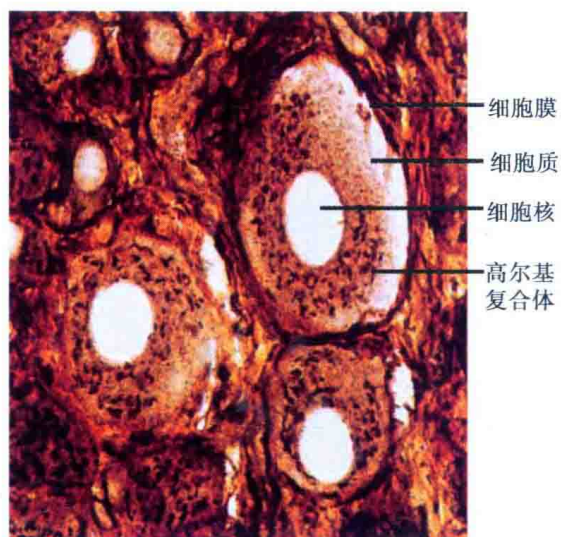


图7-1 兔脊神经节细胞(示高尔基复合体)

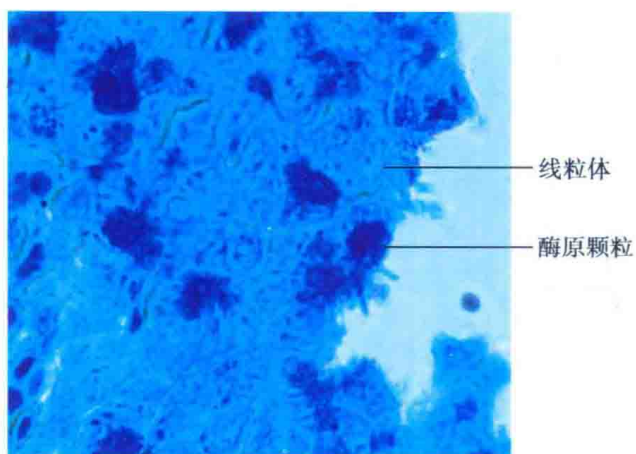


图7-2 大白鼠胰腺细胞劳弗氏快蓝染色(示线粒体)

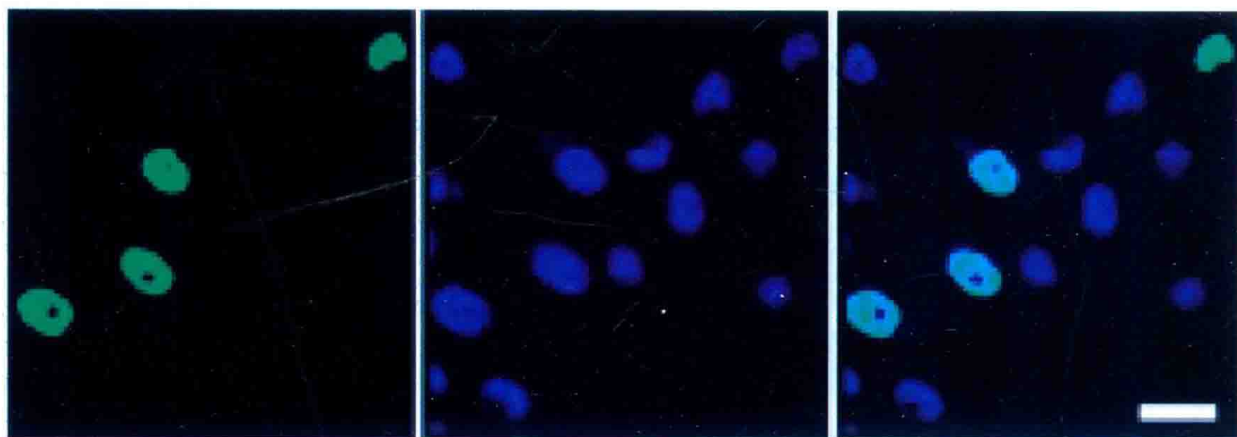


图25-2 BrdU掺入法检测S期细胞

目 录

第一篇 显微镜技术

引言	1
实验一 普通光学显微镜的使用及细胞形态的观察	3
实验二 相差显微镜的使用	10
实验三 荧光显微镜的使用和细胞的荧光染色	15
实验四 电子显微镜	24
实验五 显微摄影	37

第二篇 细胞结构及成分的显示

引言	45
实验六 DNA和RNA的测定	46
实验七 细胞器的观察	49
实验八 线粒体和液泡系的活体染色	52
实验九 微管与微丝的观察	55
实验十 毛囊细胞核仁组织区银染法	58

第三篇 亚细胞结构的分离与鉴定

引言	61
实验十一 离心技术	62
实验十二 细胞组分的分离与鉴定	67

第四篇 细胞培养

引言	71
实验十三 原代细胞和传代细胞的培养	72
实验十四 小鼠胚胎干细胞的培养	78
实验十五 细胞计数与显微测量	83

第五篇 细胞分子生物学和细胞遗传学技术

引言	87
实验十六 DNA的分析	88
实验十七 RNA的分析	96
实验十八 蛋白质分析	104
实验十九 染色体制备与观察	110

第六篇 细胞功能实验

引言	121
实验二十 细胞运动	122
实验二十一 细胞吞噬作用	126
实验二十二 细胞膜的性质	129
实验二十三 细胞生长	133
实验二十四 细胞衰老与死亡	137
实验二十五 细胞周期	149
实验二十六 细胞分裂	156
实验二十七 蛋白质相互作用	162
实验二十八 RNA干扰	165

第一篇 显微镜技术

引言

显微镜是细胞生物学研究领域的科技工作者观察了解各种细胞和微观结构所必需的研究工具。根据人眼睛的生理结构及其几何光学性质计算得知,人的裸眼不能直接观察到比0.2毫米更小的物体或物质的结构细节。然而普通光学显微镜的发明,使人类的视觉得以延伸,借此人们可以观察到像细菌、细胞那样小尺寸的物体。普通光学显微镜是引领人们进入微观世界的第一代视觉扩展工具。17世纪末,列文·虎克研制成功了第一台光学显微镜。但由于光波经透镜组合要产生衍射效应,普通光学显微镜即使没有任何像差,它的分辨本领也要受到衍射的限制,使得普通光学显微镜的分辨率不会很高。

在普通光学显微镜的基础上,人们根据光的波粒二象性,对早期的普通光学显微镜进行了各种改造,现在根据被观测对象、放大倍数、分辨率、精密程度、用途以及目的要求的不同,显微镜可以分为很多不同种类。除了普通光学显微镜外,还有倒置显微镜,相差显微镜,荧光显微镜,电子显微镜等。

细胞生物学实验课的教学目的,主要是通过基本技能训练及观察分析实验结果,使学生了解掌握有关的实验技术原理和操作方法,进而提高学生动手实践、观察分析和解决问题的能力。本篇主要是关于各种显微镜的原理和使用方法,通过对本篇的学习和实践,必须掌握普通光学显微镜,相差显微镜,荧光显微镜,电子显微镜等的成像原理、基本构造,以及正确使用方法。为日后的专业课学习和实际科研工作打下基础。

第一篇共设计五个实验。第一个实验是普通光学显微镜,内容包括显微镜的使用,细胞形态的观察和临时玻片的制作等,普通光学显微镜适合观察各种动植物细胞,组织切片,还有各种肉眼无法看到的微生物。实验二是相差显微镜,相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位,并且利用光的衍射和干涉现象,把相差变成振幅差(明暗差),同时它还吸收部分直射光线,以增大其明暗的反差。因此可用以观察活细胞或未染色标本。本实验主要内容是关于如何使用相差显微镜观察活的细胞。实验三是荧光显微镜,主要内容是关于荧光显微镜的使用和免疫荧光染色的方法。荧光显微镜是免疫荧光组织化学的基本工具,是细胞生物学实验和研究中的重要仪器之一。荧光显微镜是利用一个高发光效率的点光源,经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光,激发检测标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后,通过物镜和目镜系统的放大以观察标本的荧光图像的光学显微镜。利用荧光显微镜可以看见荧光所在的细胞或组织,从而确定抗原或抗体的性质和定位,以及利用定量技术测定含量。由于免疫荧光组织化学的特异性、快速性和在细胞水平定位的准确性,已在细胞生物学、免疫学、微生物学、病理学、肿瘤学以及临床检验等许多方面得到广泛应用,发挥了重要的作用。实验四是电

子显微镜(电镜),细胞生物学的形成和发展与电镜的应用有着极为密切的关系。人们借助电镜在细胞中发现了在光镜下无法看到的许多精细结构,这些细胞超微结构的阐明对人类认识细胞中各种生命活动的规律以及各种结构与功能的关系有重要意义,电子显微镜是细胞生物学等众多领域的强有力的研究工具,获得了越来越广泛的应用。电镜的出现,大大地推进了细胞超微结构的研究,使人们发现内质网、溶酶体、核糖体等多种细胞器,同时,对质膜、细胞核和线粒体等细胞器的细微构造有更深刻的认识。从电子显微镜诞生至今的几十年的时间里,电子显微术有了惊人的进展,电子显微镜技术一直是研究物质微细结构的重要手段。目前已经发展成为电子显微镜科学,它包括电镜的设计与制造、电镜样品的制备及电子显微镜图像的分析、处理等方面的内容。目前,除了性能十分完善的透射式电镜外,还有许多不同类型的电镜被应用于细胞生物学及其他研究领域,如扫描式电镜、高压电镜、超高压电镜、分析电镜、全息电镜和扫描透射电镜等。本实验主要内容是关于电镜的原理及使用,包括透射式电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和扫描式电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)。还为此专门介绍了两种电镜动物标本样品的制备。实验五是显微摄影。显微摄影术是一种利用显微照相装置,把显微镜视野中所观察到物件的细微结构真实地记录下来,以供进一步分析研究之用的一种技术。它在科学研究中,尤其是医学、生物学研究领域中已成为一项常规又不可缺少的研究技术之一。

(涂知明)

实验一 普通光学显微镜的使用及细胞形态的观察

显微镜是由一个透镜或几个透镜组合构成的一种光学仪器,它将一个全新的微观世界展现在人类面前。人们第一次看到了数以百计的“新的”微小动物和植物细胞,以及各种生物细胞的内部构造。显微镜还有助于科学家发现新物种,也有助于疾病的诊断和治疗。本实验主要包括普通光学显微镜的构造及使用、临时玻片的制作与观察、细胞的基本形态与结构观察三个部分。

一、普通光学显微镜的构造及使用

(一)实验目的和要求

1. 熟悉普通光学显微镜的基本构造和性能。
2. 初步掌握显微镜的使用技术。

(二)实验用品

1. 材料 擦镜纸、纱布、镜油瓶或二室瓶。
2. 器材 普通光学显微镜(双目镜筒或单目镜筒类型)。
3. 试剂 无水乙醇、乙醚、香柏油。

(三)实验内容与方法

光学显微镜统称光镜。它是借助光所形成的像来观察并研究物体细微结构的精密光学仪器,是医学教学、临床工作及科学研究诸领域中广泛使用的重要观测工具。

1. 显微镜的构造及性能 光学显微镜由机械部分、照明部分和光学部分构成。

(1)机械部分:由精密而牢固的零件组成,包括如下构造:

镜座:是显微镜的基座,位于最底部。通常呈长方形或马蹄形,用以支持和稳固镜体,其上装有照明部分的反光镜。

镜柱:是镜座上方垂直的柱形粗大部分,上端与弯曲的镜臂相连。在其两侧有突出的圆形螺旋,为调节器。

镜臂:紧接镜柱顶部并向前弯曲,上端与镜筒相连,也是取用显微镜时手握之处。

镜筒:是连于镜臂前或上方的结构,呈圆筒状或矩形,顶部装有目镜(单目或双目)。

镜台(载物台):与镜柱相连,为一块方形(或圆形)平板,用以放置标本。镜台中央有一圆形通光孔,由反光镜反射来的光线经此孔射向标本。镜台上装有推进器。

推进器:位于镜台后部。在镜台左下方有上下两个同轴螺旋,转动时,可使推进器前后或左右移动。推进器上装有可动的弹簧夹,用于固定玻片标本。

游标尺:推进器后方与侧面上有纵横游标尺,用以测量标本在视野中的位置和长度。它由主标尺 m 和副标尺 n 组成。主标尺刻有1mm的分度;副标尺刻有 $9/10$ mm的分度,读数为0.1mm。使用时首先看副标尺“0”的位置,然后看与主标尺相重叠的一致点,副标尺“0”的位置在

12mm与13mm之间,而副标尺的8与主标尺的20完全重合在一起,则得知读数为12.8mm。

调节器:是装在镜柱上的大小两种螺旋,转动时可使载物台或镜臂镜筒上下移动,以调节物镜和标本之间的距离,即调节焦距。

粗调节器转动时上下移动范围较大,能迅速调节物镜与标本的距离,使物像呈现于视野中。一般用于低倍镜调焦。

细调节器转动时升降幅度小,一般在用粗调节器调焦的基础上或在使用高倍镜或油镜时,用它做比较精确的调节,从而得到完全清晰的物像,并能观察标本不同层次和不同深度的结构。在细调节器上有刻度,用以测量物体的厚度,在OLYMPUS-CHC型镜的细调节器上有180个刻度,一个刻度为 $2.5\mu\text{m}$ 。

在左侧粗调节器与镜柱之间有一窄环,称为松紧调节。可控制调节器的松紧(松紧已调好,勿轻易调动)。

在右侧粗调节器与镜柱之间有一具小柄的窄环,此柄为粗调限位柄,可使粗调节器限定镜台只能在一定范围内升降,此环已锁好,初学者勿动。

旋转盘(物镜转换器):连于镜筒下端,为一凸形圆盘,可以自由地左右转动,其下方有3~4个螺旋口,可按顺序装上不同放大倍数的物镜。当物镜转到工作位置时(即与光轴合轴),即发出“咔”的声音,否则无法观察标本。请勿随意拆卸物镜。

(2)照明部分:在载物台下方装有一套照明装置,由反光镜、聚光器、光阑组成。其照明亮度的选择可根据物镜的不同放大倍数、所观察标本的透明度及厚度而定。

反光镜:是装在镜座上的小圆镜,有平、凹两面,可向任意方向转动。用以把光源的光线反射入聚光器中,再经过通光孔照明标本。反光镜的凹面镜聚光能力强,适于光线较弱时使用,在光线较强时,宜选用平面镜。在使用平面镜时,有时会在视野内出现窗框或窗外景物,可将聚光器略下降以消除物象的干扰。

聚光器:位于镜台通光孔下方,由一组透镜组成,可将光线汇集成束,以增强照明作用。会聚后的光线经通光孔射至标本上。在聚光器的侧下方(右或左侧)有一小螺旋,转动时可升降聚光器。上升时光线强,下降时则光线弱。

光阑(光圈):位于聚光器下方,由一组金属薄片组成。其侧面有一小黑柄,移动时可使光阑开闭。当光阑开大,则光线较强,适于观察色深标本;光阑缩小,则光线较弱,适于观察透明(或无色)的标本。

光源:可以是天然光源或电光源,随情况而定。使用电光源的,在镜臂或底座侧面有电源开关及光源亮度调节钮,可根据不同需要如标本种类、染色方法的不同等来调节、选择光的亮度。

(3)光学部分:由物镜和目镜组成。

物镜:是决定显微镜质量、分辨力和放大倍数最关键的光学部分。物镜壁上刻有主要性能参数,按放大倍数不同,分述如下:

低倍镜:镜筒最短,镜面直径最大。筒上刻有“10”或“10 $\times$ ”字样,即表示放大10倍。另刻有“0.25”字样为数值孔径(简写为“N.A.”),可反映该物镜的分辨力之大小,数值愈大,表示分辨力愈高。

高倍镜:镜筒较低倍镜筒长,镜面直径较小。筒上刻有“40”或“40 $\times$ ”字样,即放大40倍。另刻有“0.65”及“0.17”字样,分别表示其N.A.及物镜要求的盖玻片厚度。

油镜:镜筒最长,镜面直径最小。筒上刻“100”或“100 $\times$ ”字样,即放大100倍。另刻有“HL”

表示油镜;“1.30”为N.A.值。

目镜:它将物镜放大形成的中间像进一步放大,便于观察,但它并不能提高显微镜的分辨力。目镜位于镜筒上端,可装有一个目镜(单目镜筒)或两个目镜(双目镜筒),其上刻有“ $10\times$ ”或“ $15\times$ ”等字样,表示其放大倍数。目镜通常由两个透镜组成,上面与眼接触的为接目透镜;下面的叫视野透镜(在镜筒内,可不观察)。目镜中装有一指针,可以指示视野中的某一部分,以便提问或讨论。

显微镜的总放大倍数的计算是目镜放大倍数与物镜放大倍数之积。如目镜为“ $10\times$ ”,物镜为“40”,则物体放大倍数为400倍。

2. 显微镜的使用方法

(1) 低倍镜的使用方法

1) 显微镜的提取与安放:使用时,打开镜箱,右手握住镜臂,左手托住镜座,保持平稳状态轻轻放在实验台上。如使用的为双目镜筒的显微镜应放在观察者的正前方;如使用的为单目镜筒的显微镜时,应放在观察者的左前方。显微镜距桌沿约3~6cm。调节凳的高度,使眼与目镜接近,以便观察并保持姿势端正。

2) 对光:转动旋转盘,使低倍镜对准镜台上的通光孔,当听到“咔”的轻微碰击声时,说明目镜与物镜的光轴一致。打开光阑,上升聚光器。两眼睁开,在目镜上观察,转动反光镜,使它朝向光源,直至目镜中视野范围内的光线均匀,亮度适宜为止。在连接电光源显微镜的电源插头与插座之前,请先检查显微镜的电源开关是否处于“关”或“O”,以及光源亮度调节钮是否调到最小。插上电源后,可打开电源开关至“开”或“-”,再将光源亮度渐渐转大,调节至适宜为止。

3) 置片:取玻片标本,使有盖片的一面朝上(无盖片的标本应使有材料一面朝上),放在载物台上,用弹簧夹夹住。然后用左手转动推进器螺旋,将标本移至通光孔中央。

4) 调焦:先从显微镜的侧面注视低倍镜,转动粗调节器使镜台上升至距标本0.5cm处,根据显微镜类型各取下述方法继续操作:

如使用单目镜筒:用左眼从目镜中观察视野,同时右眼要张开。再慢慢转动粗调节器,使镜台慢慢下降,直到视野中出现物像为止。

如使用双目镜筒:首先调节双目镜间的距离,使之与观察者的瞳孔距离一致。调节时分别用双手的拇指、食指把住目镜下黑色横板(双目镜筒间调节座)的边缘,向外拉或向内推,此时双目在两眼目镜上观察,直至看到一个大而明亮的视野为止,读出目镜筒间距数值。然后,旋转右镜筒长度补偿环的刻度值,使与双目镜筒间距数值一致并对准环下外侧的白色刻度线。再转动粗调节器,使镜台慢慢下降,直到右眼所观察的物像清晰。随后再旋转左镜筒长度补偿环,至物像清晰为止。通过以上操作,左右目镜的焦点已对好,此镜筒长就能保持物镜的放大倍数和同等焦距正确,并调节双目镜筒的距离和补偿观察者两眼的视度差。在操作时必须两眼张开,两手并用(右手操纵调节器,左手操纵推进器),并养成这种习惯。

(2) 高倍镜的使用方法:先从低倍镜下看清物像并移到视野中央,然后可直接换用高倍镜观察。转换高倍镜时速度要慢,并从侧面观察,防止高倍镜碰撞玻片。转换好高倍镜后,从目镜上观察,慢慢转动细调节器(切勿用粗调节器,以防压碎玻片、损坏镜头),直至物像清晰为止。观察时如光线较弱,可调节照明系统,使光线适宜。如在视野内找不到物像,说明观察的目的物不在视野中央,或焦距不对,必须从低倍镜开始按上述过程重新操作。

(3) 油镜的使用方法:把在高倍镜下观察的目的物,移至视野中央后,移开高倍镜,在玻片

标本上滴一滴香柏油,眼睛从侧面注视镜头,轻轻转换油镜,使镜头浸在“油”中。观察时,只需略微转动细调节器,就能看清物像。

观察完毕后,转动旋转盘,移开油镜,转动粗调节器,使镜台下降,取下制片,在一张擦镜纸上滴加去油剂,擦净镜头上的香柏油,再另换一张干净擦镜纸再揩擦两次。有盖玻片的标本也按上法擦净,无盖玻片的标本不要擦。

(四)显微镜使用的注意事项与维护

显微镜是贵重的精密仪器,要做到正确而熟练地使用,应注意如下事项。

1. 操作时注意事项

(1)放置玻片标本时,应特别注意有材料的一面朝上,切勿反放。反放对低倍镜影响不大,但当换用高倍镜或油镜时,不但在视野内找不到物像,而且容易损坏物镜上的透镜及标本。

(2)掌握粗、细调节器的转动方向与镜台升降的关系,调焦时一定要从侧面注视,使镜台上升至0.5cm处,然后再下降,以免压坏标本和镜头。

(3)在使用双目镜筒观察时,首先要调好双目的瞳孔距离及镜筒长度补偿环的数值刻度。

(4)观察任何标本时,都应从低倍镜开始。使用高倍镜,也要先在低倍镜下找到物像,并将所要观察的部分移至视野中央,再调到高倍镜。如使用油镜,也要按先低倍镜后高倍镜再油镜的顺序进行。

(5)观察色深的标本适于用较强的光线,观察透明或色浅的标本适于用较弱的光线。

(6)观察时姿势要端正,两眼都张开。使用单目镜筒左眼观察,左手调节焦距,右眼和右手则用于绘图。

2. 显微镜的维护

(1)按要求拿取显微镜,切勿单手提取,前后摆动,以免碰坏或使部件脱落。

(2)显微镜离实验台边缘应保持一定距离,以免翻倒落地。

(3)使用前要检查,发现问题,立即报告老师。

(4)不得随意拆卸任何部件,不得转动已锁好的部件。

(5)显微镜用前用毕都应擦拭干净。机械部分用纱布揩擦;光学部分和照明部分用擦镜纸揩擦,不得用手摸或用其他物品擦拭。

(6)转换物镜时,应使用旋转盘,不得用力拨动物镜头。

(7)不得将临时制片的水或药品沾污镜头和镜台。

(8)使用完毕,应降下镜台,取下玻片标本,旋转转换器,使物镜离开通光孔,并使三个物镜均向前方。如有四个物镜,则使最低倍数的物镜对准通光孔。使反光镜镜面与镜柱平行,最后将各部分揩净,将显微镜放回原处。

(五)作业与思考题

1. 作业 简述显微镜的使用过程及注意事项。

2. 思考题

(1)使用显微镜时,是否光线愈强愈好?

(2)为什么在使用高倍镜或油镜时,必须从低倍镜开始观察,并把目标移至视野中央?

(3)显微镜下看到的物像是正像还是反像?物像与玻片的移动方向是否一致?

(4)光学显微镜由哪几部分构成?

(5)照明部分由哪几部分构成?

(6)当观察的时候,低倍镜下物像清晰,但一旦转为高倍镜,则不能观察到物像,排除显微

镜本身的原因,请问故障在哪里? 这样有什么后果?

二、临时玻片的制作与观察

(一)实验目的和要求

1. 初步掌握临时制片的方法。
2. 进一步掌握显微镜的使用技术,学习生物显微绘图的方法。
3. 了解光镜下动植物细胞的基本形态结构。

(二)实验用品

1. 材料 洋葱鳞茎、口腔黏膜上皮、大白鼠精子、蟾蜍或蛙血。
2. 器材 光学显微镜、解剖刀、镊子、剪刀、解剖针、载玻片、盖玻片、牙签、吸水纸、擦镜纸、纱布。
3. 试剂 2%碘液、Giemsa染液。

(三)实验内容与方法

1. 洋葱鳞叶表皮细胞制片与观察 取一洗净的载玻片,以左手拇指及中指夹住载玻片的两端,右手拇指及食指夹住纱布(或擦镜纸),轻轻擦拭玻片的两面,直到透明为止。

盖玻片的擦拭方法与载玻片相同,但盖玻片小而薄,擦拭时须格外小心,用力要均匀,否则容易破碎。

在载玻片中央滴一滴清水,在洋葱地下茎鳞叶的内侧面(即凹的一面)有一层膜状的半透明的表皮,用镊子轻轻撕下2~3mm²大小的表皮一块,置载玻片水滴上,铺平,轻轻盖上盖玻片(加盖玻片的方法:用镊子轻轻夹住盖玻片的一侧或用拇指、食指夹住两侧,使盖玻片的另一侧先接触水滴,然后逐渐放下盖玻片,至完全平放在标本上为止)。置显微镜下观察,先用低倍镜再用高倍镜观察,可见许多长柱状排列整齐,彼此相连的细胞,其内有时可见到圆形的核。

在盖玻片一侧的边缘加碘液1滴(注意:不要将碘液加在盖玻片上),用吸水纸从相对的一侧吸水,引染液入盖玻片内,在低倍镜下选择一个较典型的细胞,移至视野中央,再转换高倍镜仔细观察以下结构:

(1)细胞壁(cell wall):为细胞最外面的一层由纤维素组成的较厚的壁(它是植物细胞的重要特征之一)。细胞膜位于细胞壁内侧并与其紧密相贴,光学显微镜下不易分辨。

(2)细胞核(nucleus):多位于细胞中部,染为深黄色的圆形或椭圆形结构,核内有一个或者几个颗粒状的核仁(nucleolus)。

(3)细胞质(cytoplasm):是细胞膜与细胞核之间的区域,其中有时可看到点状或泡状的液泡。

2. 人口腔黏膜上皮细胞制片与观察 在清洁的载玻片中央滴一滴碘液。用牙签的宽头轻刮自己口腔下唇的内侧或两侧颊部的上皮,将刮下的黏膜细胞洗于玻片碘液中(可能肉眼觉察不到),轻轻搅动,使细胞散开。盖上盖玻片,盖玻片与载玻片之间不能有气泡,也不能让碘液溢出盖玻片,如有多余的碘液,用吸水纸吸去。

将制好的临时玻片标本置于显微镜的载物台上,先用低倍镜观察,可见被染成黄色的细胞,成群或分散存在。选择完整而轮廓清楚没有重叠的细胞移至视野中央,再转高倍镜观察以下结构:

(1)细胞膜(cell membrane):细胞呈扁平形,细胞的外面有一层薄膜叫细胞膜(如铺展不好,则细胞膜会出现皱褶)。

(2)细胞核:位于细胞中部,染色较深,呈圆形或椭圆形,核中可见一致密的结构,即为核仁。

(3) 细胞质: 是细胞膜与细胞核之间的区域, 染色较浅。

3. 大白鼠的精子涂片及观察 取大白鼠的附睾头从中横切为两段, 用镊子夹住, 让切面在载玻片上轻轻涂(用力均匀不要太大, 否则易使精子头部脱落)。待干后, 用吸管吸入Giemsa染液, 滴于涂片上, 染色20分钟, 用水冲洗, 然后插入玻片板上, 待干后进行观察。镜下可见, 大白鼠的精子由头部、中部和尾丝三部分构成。

4. 蟾蜍(或蛙)血涂片的制备与观察 将蟾蜍用乙醚麻醉后, 剪开胸腔, 打开心包, 取心脏血滴一滴在洁净的载玻片一端, 另取一块边缘平整的载玻片将血滴推成较薄的血涂片, 晾干。先在低倍镜下, 再用高倍镜观察。辨认红细胞, 呈椭圆形, 浅橙红色, 中部可见一椭圆形的核(其他细胞不辨认)。

(四) 作业与思考题

1. 作业 绘口腔上皮细胞、洋葱表皮细胞图, 并注明细胞各部分名称。
2. 思考题 洋葱表皮细胞在光镜下, 细胞核一般位于什么部位? 什么形状? 染成了什么颜色?

三、细胞的基本形态与结构观察

(一) 实验目的和要求

1. 通过对不同形态动物细胞的观察, 掌握光镜下细胞的基本形态结构。
2. 熟悉生物显微绘图的方法。

(二) 实验用品

1. 材料 蛙表皮玻片标本、神经细胞玻片标本、卵巢切片标本、人精子涂片标本、平滑肌装片标本。

2. 器材 光学显微镜、永久装片、擦镜纸、纱布。

(三) 实验内容与方法

使用显微镜观察以下不同形态的动物细胞:

1. 扁平上皮细胞 取蛙表皮玻片标本, 在低倍镜下观察, 可见染成蓝绿色的薄膜, 这是从蛙体表剥落下来的一层表皮。高倍镜下观察, 可见染成深蓝色的圆形或椭圆形结构, 这是细胞核, 围绕细胞核的是细胞质, 在细胞质的外围有深染的线条, 分隔各个细胞, 可见蛙表皮细胞为排列紧密的多边形细胞。

2. 圆形细胞 取卵巢切片标本, 置低倍镜下观察, 在标本的外周部分可见到一些较普通细胞大很多的圆形卵细胞, 呈红色。换高倍镜观察, 可见卵细胞被染色较深的透明带包绕, 透明带外又被染成紫红色的细胞围绕, 称为放射冠。由于切片的原因, 在视野中也可能看到没有经过细胞核的切面, 因而只观察到细胞质而看不到细胞核。此外, 成熟的卵细胞还可观察到卵泡腔(图1-1/文末彩图1-1)。

3. 蝌蚪形细胞 取人精子涂片低倍镜观察, 可见许多染成红色的小颗粒, 即为人的精子, 转换高倍镜观察, 可观察到很多蝌蚪形的精子, 着色较深的圆形部分为头部, 内有细胞核。细长的部分称为尾部, 在头部与尾部之间有很短的颈部, 但在标本上不易区分。

4. 星形细胞 取神经细胞染色标本在低倍镜下观察, 可见许多分布不均匀, 着色很深并呈不规则突起的神经细胞, 然后换高倍镜观察(图1-2/文末彩图1-2)。

5. 梭形细胞 取平滑肌分离装片标本观察, 可见染成红色的呈梭形的细胞, 此为平滑肌细胞, 细胞中央染成淡蓝色的为细胞核, 多呈圆形或椭圆形。

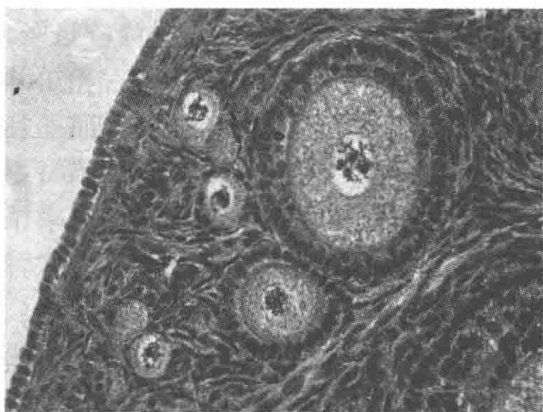


图1-1 兔卵巢部分结构示意图

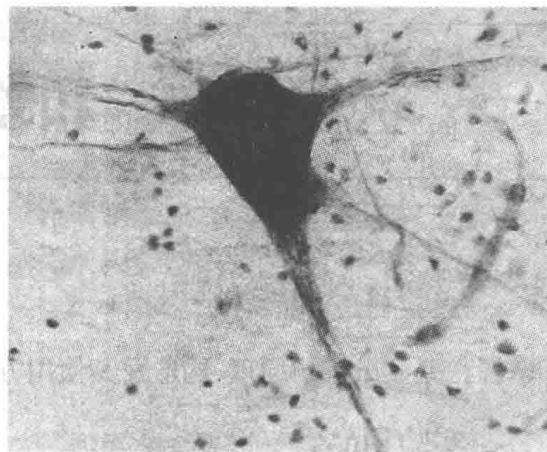


图1-2 猪神经细胞图

(四)作业与思考题

1. 作业 绘所观察的各种细胞形态图,并注明各部分名称。
2. 思考题 观察平滑肌分离装片标本,平滑肌细胞被染成什么颜色?呈什么形状?

(项 荣 刘艳平)