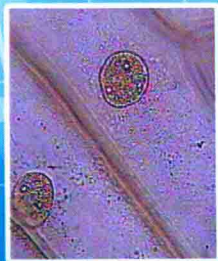
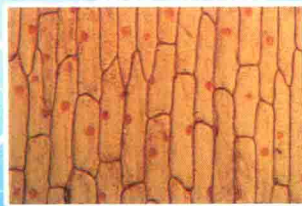
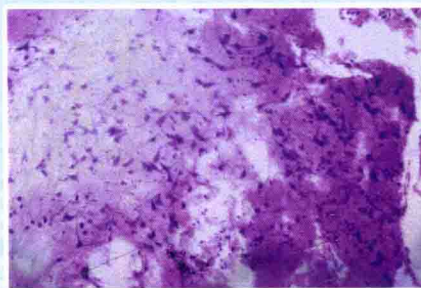
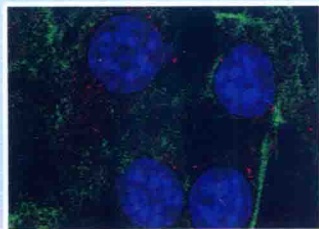


DNA

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学 实验教程

主 编 张雅青



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学实验教程

主 编 张雅青

副主编 苏 露

编 委 (按姓名拼音排序)

董开忠 傅思武 苏 露 张雅青

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书按照医疗岗位胜任力要求,根据高等院校医学生的培养目标所需要的基本理论和基本技能,选编了46个实验。全书分为显微镜技术、细胞生物学技术、细胞形态的观察、细胞成分的显示技术、综合性实验5篇。内容包括经典实验、设计性实验和综合性实验。加强了三基训练,同时加强和充实了反映现代细胞生物学发展水平的高技术项目,培养和提高学生的动手能力和发现问题、分析问题、解决问题的能力。

本书适用于高等医学院校本科医学教学,也可作为临床检验工具书、科研参考书。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验教程 / 张雅青主编. —北京: 科学出版社, 2015.10
全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-045866-7

I. ①医… II. ①张… III. ①人体细胞学-细胞生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 231583 号

责任编辑: 朱 华 / 责任校对: 胡小洁
责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 范璧合

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年10月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016年1月第二次印刷 印张: 13 1/2

字数: 340 000

定价: 39.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

医学细胞生物学是从显微水平、超微水平和分子水平等三个层次研究细胞结构、功能、代谢等的一门学科。医学细胞生物学实验课的目的，主要在于进行细胞生物学基本技能的训练，验证部分基本原理，训练科学思维方法，养成学习习惯，培养作风以及独立分析问题和解决问题的能力。细胞生物学是医学临床、口腔、护理以及检验技术专业本科生的一门重要基础课程。

为适应目前教学工作的需要，培养实用型人才，提高学生的动手能力，在校、院的组织和支持下，在全体编者的共同努力下，完成了这本细胞生物学实验教程，希望能借此提高学生的实验课质量，有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。本实验教程根据医药院校对本科生的教学要求，遵循适用性、科学性和启发性的原则，从实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、实验结果等方面入手，较为系统地介绍了细胞生物学的实验内容和基本实验技术。根据本课程内容分掌握、熟悉和了解部分的三级要求，重点突出，详细编写了验证性实验、综合性实验和选择设计性实验内容，力求实用、简明、清晰。便于学生在有限的时间内抓住重点加深对理论知识的理解，掌握相应的基本技能，培养和训练手脑并用，学会发现问题、思索问题并启发学生解决问题，培养学生养成实事求是和科学求真的好习惯。本书在编写过程中，参考了大量书刊资料，第二篇和第三篇实验内容为张雅青编写，其余实验内容为苏露编写。

本书是西北民族大学“十二五”校级规划教材，适用于临床本科专业、口腔本科专业、医学检验技术本科专业及护理本科专业的实验教学使用。

由于编者水平有限，本书尚有缺点和不足，敬请同行专家批评指正。我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

作 者

2015年8月

目 录

绪 论 篇

第一节	实验室规则	1
第二节	细胞生物学实验绘图方法与要求	1
第三节	常用实验动物的了解和解剖器械的使用	2

第一篇 显微镜技术

实验一	显微镜技术介绍及应用	4
实验二	倒置显微镜的原理及使用	12
实验三	相差和暗视野显微镜的原理、使用及标本观察	13
实验四	荧光显微镜原理及应用	19
实验五	电子显微镜的构造及使用方法	24

第二篇 细胞生物学技术

实验一	流式细胞技术介绍	27
实验二	细胞培养技术原理和方法	35
实验三	细胞活体染色技术	42
实验四	细胞固定染色法	45
实验五	酶联免疫吸附试验	49

第三篇 细胞形态的观察

实验一	细胞器的光镜观察	53
实验二	细胞的基本形态观察和显微测量	55
实验三	培养细胞的计数与死活鉴别	59
实验四	细胞周期的测定	63
实验五	植物细胞的有丝分裂标本的制备及观察	66
实验六	减数分裂标本的制作与观察	69
实验七	细胞的有丝分裂和减数分裂观察	74
实验八	细胞染色体的制备与观察	78
实验九	植物染色体标本的制备与观察	83
实验十	正常细胞与肿瘤细胞常规核型的标本制备	86
实验十一	染色体显带技术和带型分析	90
实验十二	细胞骨架的光学显微镜观察	94
实验十三	细胞中的微丝染色及观察	98
实验十四	细胞生长曲线的测定及绘制	101

实验十五	胞间连丝的观察	103
实验十六	免疫荧光抗体法检查细胞表面抗原	105

第四篇 细胞成分的显示技术

实验一	酸性磷酸酶的显示方法	107
实验二	碱性磷酸酶的显示方法	110
实验三	细胞内过氧化酶的显示	112
实验四	细胞酸性蛋白与碱性蛋白的显示	114
实验五	过碘酸雪夫反应(PAS)显示多糖类物质	116
实验六	细胞组分的分离与观察	119
实验七	真核细胞 DNA 的提取	122
实验八	植物总 RNA 的提取	127
实验九	观察细胞中 DNA 和 RNA 的分布	131

第五篇 综合性实验

实验一	细胞融合	134
实验二	应用细胞融合技术制备染色体提前凝集标本	137
实验三	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	139
实验四	肿瘤细胞的软琼脂集落形成实验	143
实验五	细胞吞噬现象的观察	146
实验六	细胞膜的通透性观察	150
实验七	细胞毒性实验	152
实验八	细胞凝集反应实验	156
实验九	细胞增殖的检测方法	159
实验十	western 印迹技术	162
实验十一	细胞凋亡的检测技术	166

附 录

附录一	常用试剂的配制	171
附录二	器械的清洗和消毒	185
附录三	细胞培养用液的配制与消毒	190
附录四	配置 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶	194
附录五	实验设计的原理与方法	196
附录六	细胞生物学实验设计与选题	202
参考文献		210

绪 论 篇

第一节 实验室规则

实验室是实验课教学的重要场所，为了使实验课能够在文明、安全、有序的条件下进行，师生们必须共同遵守以下实验室规则：

一、遵守实验纪律，按时到达实验室，不得迟到或早退。实验中途因故需外出应向任课教师请假。

二、进入实验室之前要换好白大衣。

三、进入实验室后，要保持安静，不准高声喧哗，按号入座，座位固定不变，以便于管理，实验过程中保持良好的实验秩序。

四、必须严肃认真地进行实验。实验期间不得进行任何与实验无关的活动。

五、实验室内各组仪器及器材由各组自己使用，不得互相调换。要爱护器材、标本和仪器设备，对贵重精密仪器如显微镜等，应做到细心操作，精心保管。如遇仪器损坏或不灵，应及时报告任课教师，主动登记，以便修理或更换，不要自行修理。损坏器材或设备者应按有关规定进行赔偿。

六、注意节约实验材料、药品试剂和水、电等，杜绝浪费现象。

七、实验时，应按照实验指导，认真操作，仔细观察，做好实验记录，以加深理解和记忆，培养分析问题和解决问题的能力，认真完成实验报告。

八、做完试验后，实验动物尸体、纸片及实验废物等应放到指定地点，不得随意丢弃。

九、保持实验室内清洁整齐。实验结束后，各组必须认真清理各自的实验台面，将器材清洗后点清数目，然后摆放整齐。班级值日生负责清扫室内卫生，关好水、电开关和门、窗等，经教师或实验老师允许后方可离开实验室。

十、有不遵守上述要求者，任课老师将终止其实验，并取消其当堂实验成绩。

第二节 细胞生物学实验绘图方法与要求

实验报告是科学研究的记录，同学们必须学会客观地、真实地记载实验过程和结果：

一、在仔细观察切片或标本等，选择典型的形态结构进行描绘，要求真实、准确(注意各部结构的比例关系)。

二、用铅笔绘图，点线要清晰流畅，线条要明确清晰，粗细均匀，接头处无分叉和重线条痕迹，切忌重复描绘。图的深浅明暗一律以点的疏密来表示，点要圆而一致，不得涂暗影或进行其他美术加工，要根据所观察的实物作图。

三、比例要正确，绘图要按植物个器官、组织以及细胞等各部构造原有比例绘出，绘放大的解剖图或形态图时，应注明放大的倍数，也可以用短线表示出长度。倍数一般以长度的比例为准。

四、突出主要特征，植物学绘图中允许重点描绘植物的主要形态特征而其他部分可仅绘出轮廓，以表示完整性。

五、正确的标注，各部分结构名称一律用正楷书写，应尽量详细，并在右侧引直线注明，各引线要平行不得交叉。实验题目写在绘图报告纸的上方，图解，染色、放大倍数标注在图的下方。

六、每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当并注意纸面的整洁。

第三节 常用实验动物的了解和解剖器械的使用

一、常用实验动物

常用的实验动物有蟾蜍、小白鼠、大白鼠、豚鼠、猫、兔和狗等。在医学实验中，常常根据不同的实验目的而选用不同的动物进行实验研究。例如，蟾蜍可以用于观察离体心脏搏动情况的实验，小白鼠常用于样本很大的实验(如药物的半数致死量的测定等)，猫常用于测定脑内电位的实验，而狗是局解手术中常用的实验动物。

在我们细胞生物学实验中，除应用培养细胞外，最常用的动物是蟾蜍和小白鼠，下面对其特点及基本处置做一简单的介绍。

(一) 蟾蜍

蟾蜍是两栖类动物，由于其取材方便，常用于各种实验。其细胞较哺乳类动物的细胞大得多，因此常用于观察细胞形态的实验。

1. 雌雄鉴别

通常雄性蟾蜍较雌性的为小，且在其前肢的1—3趾基部有被称为“婚垫”的黑疣。

2. 捉拿及处死方法

常用捣髓法处死蟾蜍，即用解剖针捣毁其脑组织和脊髓。具体方法是，左手握住蟾蜍的身体和四肢，使其腹部贴着掌心，食指压住蟾蜍头部前端使其尽量腹屈。在头与躯干之间可触及一凹陷(即枕骨大孔所在处)，右手持解剖针直插入此凹陷1—2mm，随即将针尖转向头侧插入颅腔捣毁脑组织。然后将解剖针抽回并转向尾侧刺入脊椎管内捣毁其脊髓。如此直至其四肢松软，呼吸消失为止。

(二) 小白鼠

小白鼠是哺乳动物，是最为常用的实验动物。

1. 捉拿方法

将小白鼠放在鼠笼盖铁网上，用右手持其尾巴向后拉，小鼠则会尽力向前蹬。用左手的拇指和食指抓住其头顶部皮肤，然后用左手小指与手掌之间夹住其尾巴。

2. 处死方法

处死应以安乐死为原则，即使之无痛苦而迅速死亡。常用的方法有颈椎脱位法，断头法和二氧化碳吸入法等。断头法需用特殊的断头器，二氧化碳吸入法则将小鼠放入盛有二氧化碳的容器内即可。颈椎脱位法的具体方法是：左手拇指和食指按住小白鼠的头部，左

手捉住其尾巴迅速向后猛拉，使其颈椎脱位而立即死亡。

3. 给药方法

小白鼠的给药途径有经口给药、腹腔内注射、尾静脉注射、皮下注射、皮内注射和肌肉注射等。我们常用的是腹腔注射。具体方法是：左手捉住小鼠(如前所述)，在其腹正中线稍外侧(避开膀胱和血管)用酒精消毒后，首先将注射针头向头部方向刺入皮下，进针1—2mm后，再以45°角刺穿腹部肌肉而进入腹腔(刺穿腹肌时有一落空感)。针头刺入腹腔后切勿左右摆动，以免损伤肠管或肝脏。注意每次注入的液体量应为0.1—0.2mL/10g体重。

二、常用手术器械及操作方法

1. 解剖针

用于挑、刺等。常用来捣髓处死蟾蜍，持法如执笔法。

2. 解剖刀(即外科手术刀)

用于各种皮肤切口和组织切除等。持法有执弓法与执笔法两种。前者用于较大力量切开较长距离的坚韧的组织，如大动物的皮肤切口等；后者则用于小力量的短距离切开，或分离皮肤和肌肉等。

3. 大剪刀

用于剪毛、皮肤、皮下组织和肌肉等。持法如图。

4. 眼科剪刀

用于剪断神经、血管、筋膜等细软组织。

5. 眼科镊子

用于提取神经、血管和筋膜等细软组织。

6. 钝头镊子

用于提取脏器、组织等。

7. 有钩镊子

用于提取皮肤切口等。

(张雅青)

第一篇 显微镜技术

实验一 显微镜技术介绍及应用

【实验目的】

- (1) 熟悉普通光学显微镜的基本构造及其功能。
- (2) 掌握低倍镜及高倍镜的使用方法。
- (3) 初步掌握油镜的使用及维护方法。
- (4) 了解电子显微镜技术的原理及用途。

【实验原理】

光学显微镜(light microscope)又称生物显微镜或光镜,是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的主要部件是物镜和目镜,均为凸透镜。两者的乘积就是显微镜的放大倍数。物镜的焦距短,目镜的焦距较长。

物镜到被观察物 AB 的距离稍大于物镜的焦距,通过物镜得到倒立的放大的实像 A'B'。A'B'对目镜来说是物体,使 A'B'位于目镜的焦点以内,这样通过目镜就得到 A'B'的放大的虚像 A''B''。从图 1-1-1 上可以看出, A'B'的视角比眼睛直接看 AB 时的视角大得多,所以用显微镜可以看清非常微小的物体,如图 1-1-1 所示。

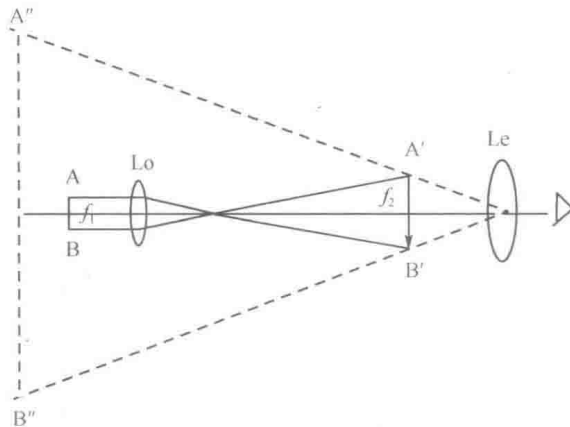


图 1-1-1 普通显微镜成像光路图

【器材与试剂】

- (1) 普通光学显微镜。
- (2) 擦镜纸。
- (3) 香柏油或液状石蜡(石蜡油)、清洁剂(二甲苯)。
- (4) 兔脊神经节切片(银染色,示高尔基复合体)。

(一) 光学显微镜的基本构造及功能

·参见图 1-1-2。

1. 显微镜的机械部分

显微镜的机械装置包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗、细调节螺旋等部件。它起着支撑、调节、固定的作用。

(1) 镜座：镜座是显微镜的基本支架，稳定和支持整个镜体。

(2) 镜柱：镜座上面直立的短柱，连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂：镜柱上面的弯曲部分，支持镜筒和载物台，取放显微镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有可活动的倾斜关节，可使镜臂适当倾斜，便于观察；镜筒倾斜式显微镜的镜臂与镜柱连为一体，无倾斜关节。

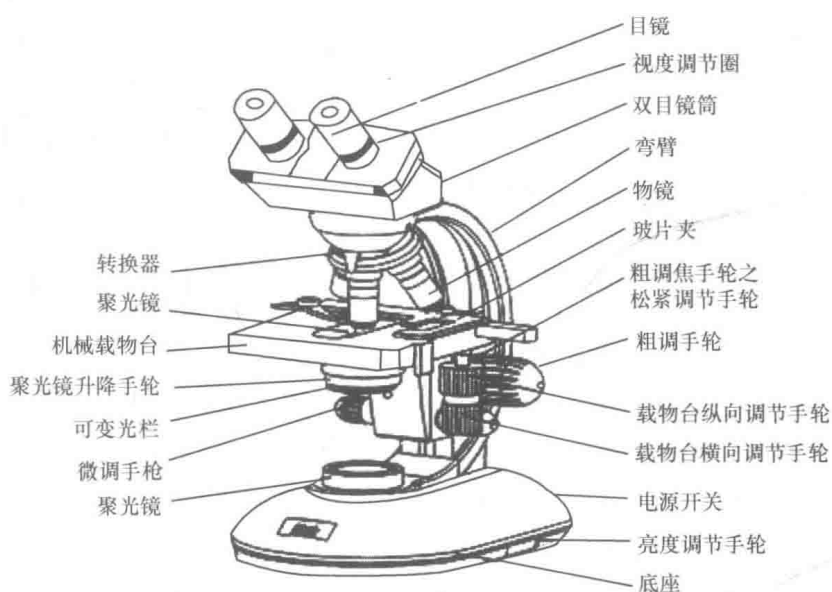


图 1-1-2 普通光学显微镜

(4) 镜筒：镜臂前上方的圆筒。镜筒上端安装目镜，下端安装物镜转换器，并且保护成像的光路与亮度。镜筒有单筒式和双筒式，单筒式又有直立和倾斜式两种，双筒式均为倾斜式。

从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化，不仅放大倍率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

(5) 物镜转换器：镜筒下方的圆盘状部件，盘上有 3—4 个圆孔，安装了不同放大倍数的物镜(低倍、高倍、油镜)，转动物镜转换器，可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通，与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

(6) 载物台：放置标本片的平台，中央有通光孔，光线通过此孔照射在标本片上，镜台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用为固定或移动标本的位置，使得镜检对象恰好位于视野中心。

(7) 推动器：是移动标本的机械装置，它是由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成的，好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。如果需重复观察已检查标本的某一部分，在第一次检查时，可记下纵横标尺的数值，以后按数值移动推动器，就可以找到原来标本的位置。

(8) 调节器：装在镜臂或镜柱两侧的粗细螺旋，用以调节焦距。

1) 粗调节器(粗螺旋)：转动时可使载物台(镜筒倾斜式显微镜)或镜筒(镜筒直立式显微镜)大幅度升降，迅速调节物镜和标本间距离使物像出现在视野中。在使用低倍镜时，先用粗调节器找到物像。

2) 细调节器(细螺旋)：转动时可使镜台或镜筒短距离升降，使用高倍、油镜时或低倍镜下为了得到更清晰的物像时使用。微调螺旋每转一圈镜筒移动 0.1mm ($100\mu\text{m}$)。新近出产的较高档次的显微镜的粗调螺旋和微调螺旋是共轴的。

(9) 眼间距调整：使两目镜与两眼间距离一致，不同的人两眼间距离不同，应根据自己的情况加以调节。

(10) 瞳距的调整：使两目镜与两眼间距离一致，不同的人两眼间距离不同，应根据自己的情况加以调节。

2. 显微镜的照明部分

安装在载物台下方，包括反光镜、聚光器、光圈。

(1) 反光镜：较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体，在镜座上装有反光镜。反光镜是由平、凹两面镜组成，可向任意方向转动，将投射在它上面的光线反射到聚光器的中央，照明标本。凹面镜聚光作用强，光线较弱的时候使用；平面镜聚光作用弱，光线较强时使用。电光源普通显微镜没有反光镜，一般在镜座内安装有照明装置，光线的强弱由底座上的光亮调节钮控制。

(2) 聚光镜：聚光器在载物台下面，它是由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成的，聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处，而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm 。因此，要求使用的载玻片厚度应在 $0.8\text{—}1.2\text{mm}$ ，否则被检样品不在焦点上，影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有虹彩光圈，它可以开大和缩小，影响着成像的分辨力和反差，若将虹彩光圈开放过大，超过物镜的数值孔径时，便产生光斑；若收缩虹彩光圈过小，分辨力下降，反差增大。因此，在观察时，通过虹彩光圈的调节再把视场光阑(带有视场光阑的显微镜)开启到视场周缘的外切处，使不在视场内的物体得不到任何光线的照明，以避免散射光的干扰。

3. 显微镜的光学部分

(1) 目镜：安装在镜筒上端，通常备有 2—3 个，上面刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $16\times$ 符号表示放大倍数，一般用 $10\times$ 目镜。目镜的作用是将物镜放大的标本像(实像)再放大成虚像。观察者可根据工作需要和标本的实际情况，恰当选择不同放大倍数的目镜。接目镜内常安放一指针，便于指示视野中的某一结构。目镜可旋转，目镜底部有相应的刻度，以供两眼度数不同的人调节。目镜放大倍数过大，反而会影响观察效果。

(2) 物镜：安装在物镜转换器上，一般有 3—4 个物镜，分别是 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ ($50\times$)

和 100×, 在每个接物镜的镜管上分别标有醒目的红色、黄色、蓝色和黑白相间线圈。标记 4× 和 10× 的称低倍镜, 40(50)× 称高倍镜, 100× 是油浸镜, 从外形上观察不同放大倍数的物镜, 可见油镜最长, 高倍镜次之, 低倍镜最短。通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数和数值孔径, 如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.03, 镜筒长度和所要求的载玻片厚度为: 160/0.17(mm) (表 1-1-1)。

表 1-1-1 不同倍数物镜的比较

物镜	放大倍数	镜身	数值孔径	工作距离(mm)
低倍镜	10×	短	0.25	5.40
高倍镜	40×	较长	0.65	0.39
油镜	100×	最长	1.30	0.11

(3) 滤光片: 在光阑下方有一金属圈, 可安放滤光片, 借以改变光源的色调和强弱, 便于观察和摄影。常用滤光片有三种。

- 1) 毛玻片: 减弱光强度、使光漫射而度柔和。
- 2) 蓝玻片: 白炽灯光照明时用, 将黄色灯光校正成白光。
- 3) 绿玻片: 通常适用于黑白照片, 显微摄影用。

(二) 显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低决定于光学系统的各种条件。被观察的物体必须放大率高, 而且清晰, 物体放大后, 能否呈现清晰的细微结构, 首先取决于物镜的性能, 其次为目镜和聚光镜的性能。

1. 数值孔径 (numerical aperture, NA)

数值孔径是物镜和聚光器的主要参数, 也是判断他们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系, 它与显微镜的分辨力成正比, 与焦深成反比, 与镜像亮度的平方根成正比。

数值孔径计算方程为: $NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$

NA 为数值孔径, n 为物镜与标本之间的介质折射率, α 为物镜的镜口角, 折射率大的介质分辨率也大。

几种物质的介质的折射率如下:

空气为 1.0, 水为 1.33, 玻璃为 1.5, 甘油为 1.47, 香柏油为 1.52。

2. 分辨率 (resolution)

是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力, 分辨率与物镜的数值孔径成正比, 与光波波长成反比。因此, 物镜的数值孔径愈大, 光波波长愈短, 则显微镜的分辨率愈大, 被检物体的细微结构也愈能明晰地区别出来。因此, 一个高的分辨率意味着一个小的分辨距离。显微镜的分辨率是用可分辨的最小距离 (D) 来表示的:

$$D = \lambda / 2 \cdot NA$$

D 为分辨率, λ 为光波波长, 可见光的波长为 0.4—0.7 μm , 平均波长为 0.55 μm 。若用数值孔为 0.65 的物镜, 则 $D = 0.55\mu\text{m} / 2 \times 0.65 = 0.42\mu\text{m}$ 。这表示被检物体在 0.42 μm 以上时可被观察到, 若小于 0.42 μm 就不能视见。人的分辨率可达 0.1mm, 显微镜的分辨率能达到

0.2 μm 。

3. 工作距离

指物像调节清楚时物镜下表面与盖玻片上表面之间的距离，工作距离的大小和物镜的放大倍数与数值孔径有关。物镜放大倍数和数值孔径愈大，则工作距离愈小，反之则愈大。一般油镜的工作距离最短，约为 0.2mm。因此，要求盖玻片的厚度为 0.17—0.18mm。若盖玻片过厚，就不可能将被检物体聚焦，且易引起物镜的意外损坏。

4. 焦点距离(焦距)

是指平行光线经过单一透镜后集中于一点，由这一点到透镜中心的距离。一个物镜通常是由几个不同性质的透镜组成。因此，它的焦距的测定比较复杂。一般，显微镜的物镜上都注明焦距的长度。物镜的放大倍数愈大，焦距愈短。

5. 焦点深度

在使用显微镜时，当焦点对准某一物体时，不仅位于该点平面上的各点都可看得清楚，而且在此平面的上下一定厚度内，也能看得清楚，这个清晰部分的厚度就是焦点深度。焦深与总放大率和数值孔径成反比，因此，高放大率和高数值孔径的显微镜其焦深就浅，不能看到标本的全厚度。必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。另外，被检物体周围介质(封片剂)的折射率加大可增大焦深。尤其在显微照相时，更应考虑封片剂的使用。

(三) 光学显微镜的使用方法

1. 准备工作及观察要求

(1) 将显微镜小心地从镜箱中取出(较长距离移动显微镜时应以右手握住镜臂，左手托住镜座)，放置在实验台的偏左侧，以镜座后端离实验台边缘约 3—6cm 为宜。

(2) 检查显微镜的各个部件是否完整和正常，如果是镜筒直立式光镜，可使镜筒倾斜一定角度以方便观察。但倾斜角度一般不应超过 45°，否则显微镜重心不稳，易发生倾倒。

(3) 使用显微镜观察标本时，要求双眼同睁，双手并用，逐步养成左眼观察、右眼看图，左手调焦、右手移片或绘图记录的习惯。

(4) 左右调整两个目镜之间的距离，使之适合两个眼睛的瞳距。

2. 低倍镜的使用方法

(1) 调光：打开实验台上的工作灯，转动粗调螺旋，使镜筒略升高(或使载物台下降)，调节物镜转换器，使低倍镜转到工作状态(即对准透光孔)，当镜头完全到位时，可听到轻微的扣碰声音。

然后打开光圈并使聚光器上升到适当位置(以聚光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度为宜)，双眼同睁(既防止眼睛疲劳又便于绘图)，用左眼向目镜内观察，同时调节反光镜的方向，使视野内的光线均匀、亮度适中。调光时应注意避免直射光源，以免损坏镜头，并损伤眼睛。

(2) 放置玻片标本：取一张玻片标本，先对着光线用肉眼观察标本的全貌和位置，再将玻片标本放置到载物台上用标本移动器上的弹簧夹固定好，注意使有盖玻片或标签的一面朝上。然后转动移片器的螺旋，使需要观察的标本部位对准物镜。

(3) 调焦：用眼睛从侧面注视低倍镜，同时用粗调螺旋使镜头下降(或载物台上升)，直至低倍镜头距玻片标本的距离小于 6mm(注意操作时必须从侧面注视镜头与玻片的距离，

以免镜头碰破玻片)。然后用左眼在目镜上观察,同时用左手慢慢转动粗调螺旋使镜头上升(或使载物台下降)直至视野中出现物像为止,再转动细调螺旋,使视野中的物像最清晰。

如果需观察的物像不在视野中央,甚至不在视野内,可用标本移动尺上下左右移动标本的位置使物像进入视野并移至中央。在调焦时如果镜头与玻片标本的距离已超过了1cm还未见到物像,应严格按上述步骤重新操作。

双目显微镜调焦步骤:

1)根据观察者的双眼间距调节目镜筒间距。用两只手抓住观察镜面板,调节目镜筒间距,直到通过两目镜筒同时看到完整的视场。眼间距不对,操作时容易感到疲劳,并影响物镜对焦。

2)调到适当位置时,注意读出双目间距刻度值,将右目镜筒刻度圈转到与双目间距相同的数值,闭上左眼或用不透明物遮盖左眼,用微调手轮仔细调焦显微镜,直到标本对右眼清晰成像,说明右目镜调好。

3)再闭上右眼,不需调焦,旋转左目镜筒刻度圈,直到标本对左眼清晰成像。

4)如果双目镜筒间距和刻度圈已调节适合,将得到最佳的效果。调到最佳效果。如需换到另一个物镜时,只要稍微调手轮,即可获得清楚图像。

5)为了避免每次使用显微镜都要重复这些调节,应记住各人已调好的各自的刻度值。

3. 高倍镜的使用方法

(1)在使用高倍镜前,应先用低倍镜寻找到需观察的物像,并将其移至视野中央,同时调准焦距,使被观察的物像最清晰。

(2)转动物镜转换器,直接使高倍镜转到工作状态(对准通光孔),此时,视野中一般可见到不太清晰的物像,只需调节细调螺旋便可使物像清晰。

有些显微镜在低倍镜准焦的状态下,直接转换高倍镜时会发生高倍物镜碰擦玻片而不能转换到位的情况。此时,不能硬转,应检查玻片是否放反、玻片是否过厚以及物镜是否松动等情况后重新操作。如果调整后仍不能转换,则属高倍镜过长,此时应将载物台下降或使镜筒升高后再转换,然后在眼睛的注视下使高倍镜贴近盖玻片,再边观察目镜视野边用粗调螺旋极缓慢地使载物台下降或镜筒上升,看到物像后再用细调螺旋准焦。

4. 油镜的使用方法

(1)用高倍镜找到所需观察的标本物像,并将需要进一步放大的物镜移至视野中央。

(2)将聚光器升至较高位置并将光圈开至最大(油镜所需光线较强)。

(3)转开高倍镜,往玻片标本上需观察的部位滴一滴香柏油或液状石蜡作为介质,然后在眼睛的注视下,使油镜转至工作状态,此时油镜的下端镜面一般应正好浸在油滴中或与油滴接触。也可先稍稍下载物台或上升镜筒,使油镜对准通光孔,再使油镜下端浸入油滴中并贴近盖玻片。

(4)左眼注视目镜,同时小心而缓慢地转动细调螺旋使载物台下降或使镜头微微上升,直至视野中出现清晰的物像。操作时不要反方向转动细调螺旋,以免镜头下降压碎标本或损坏镜头。细螺旋原则上不应超过3圈。

在观察时,如发现视野中的某标本不知是何物而需要老师或同学帮助观察确定时,可将视野中的指针对准有疑问的标本。如果镜中未装指针,

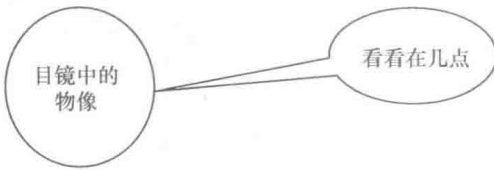


图 1-1-3 显微镜目镜中指针的位置

可将视野看成一个带有时间标记(如 3、6、9、12)的钟面, 指出有疑问标本位于几点钟的所在位置(图 1-1-3)。

(5) 油镜使用完后, 必须及时将镜头上的油擦拭干净。操作时先将油镜升高 1cm 并将其转离通光孔, 直接用擦镜纸顺时针方

方向擦拭一次, 把大部分的油擦掉后, 再用蘸有少许二甲苯的擦镜纸或脱脂棉球顺时针方向擦一次, 最好再用擦镜纸擦一次。

置于玻片标本上的油, 如果是有盖玻片的永久制片, 可直接用上述方法擦干净; 如果是无盖玻片的标本, 则载玻片上的油可用拉纸法揩擦, 即先把一小张擦镜纸盖在油滴上, 再往纸上滴几滴清洁剂或二甲苯, 趁湿将纸往外拉, 如此反复几次即可干净。

显微镜使用完毕后, 应取下玻片, 将标本放回片盒。再将镜头转离通光孔并将镜体擦拭干净, 关闭电源, 最后罩上防尘罩归位摆整齐。

(四) 使用显微镜应注意的事项

(1) 取用显微镜时, 应轻拿轻放, 较长距离移动显微镜时, 应一手紧握镜臂, 一手托住镜座, 不要用单手提拿, 以避免目镜或其他零部件滑落。

(2) 在使用镜筒直立式显微镜时, 镜筒倾斜的角度不能超过 45°, 以免重心后移使显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时, 不要使用倾斜关节, 以避免由于载物台的倾斜而使液体流到显微镜上。

(3) 不可随意拆卸显微镜上的零部件, 以免丢失或损坏, 目镜也不要随便取出以免灰尘落入镜内。

(4) 显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指揩擦, 以免磨损镜面, 需要时只能用擦镜纸轻轻擦拭。机械部分可用纱布等擦拭。

(5) 在任何时候, 特别是使用高倍镜或油镜时, 都不能一边在目镜中观察, 一边上升载物台或下降镜筒, 以避免镜头与玻片相撞, 损坏镜头或玻片标本。

(6) 显微镜使用完后应及时复原。先下降载物台或升高镜筒, 取下玻片标本, 使物镜转离通光孔, 成骑跨状或“八”字形放置。如镜筒、载物台是倾斜的, 应恢复直立或水平状态, 然后上升载物台或下降镜筒, 使物镜与载物台相接近。垂直反光镜, 下降聚光器, 关小光圈, 最后放回镜箱中锁好。

(7) 在利用显微镜观察标本时, 要养成两眼同睁、双手并用(左手操纵调焦螺旋, 右手操纵移片器)的习惯, 必要时应一边观察一边计数或绘图记录。如果两眼同睁观察不习惯, 可先用手挡住右眼, 等左眼看清视野后逐渐放开右眼, 反复练习后便可达到要求。观察时双眼同睁既可防止眼睛疲劳又方便绘图。

(五) 操作练习

以脊神经节(高尔基体)切片为材料, 严格按照上述操作程序反复练习低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。结果如图 1-1-4。

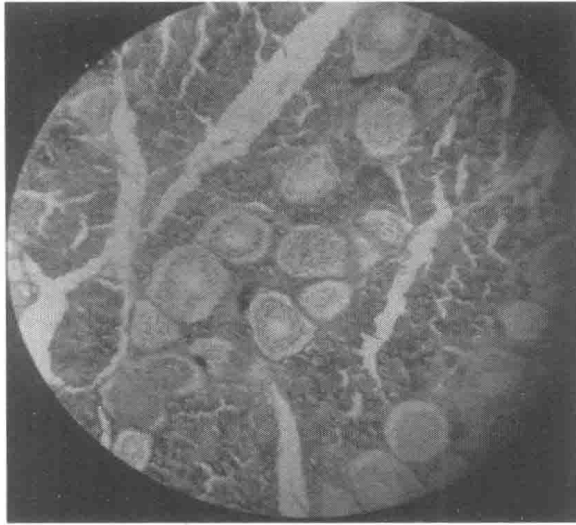


图 1-1-4 显微镜下脊神经节高尔基复合体

(六) 电子显微镜的原理及用途

VCD 示教。

【实验报告及作业】

- (1) 简述显微镜的主要组成部分。
- (2) 电子显微镜在医学领域有哪些用途？

(张雅青)