

细胞生物学实验教程

(第二版)

王亚男 马丹炜 主编



科学出版社



细胞生物学实验教程

第二版

王亚男 马丹炜 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本教材从基础性实验、综合性实验和设计性实验 3 个层面设置了 39 个实验项目,旨在培养学生的细胞生物学基本实验技能和综合创新能力。内容涵盖光学显微镜技术、细胞化学技术、细胞器的分离和鉴定技术、染色体标本制作技术、细胞培养和细胞融合技术、染色体畸变检测技术、细胞凋亡检测技术,以及细胞生物学设计性实验的选题、设计和实施等内容。附录部分附有常用试剂的配制、光学显微镜维护、电子显微镜的构造和使用方法、器械清洗方法、常用参数换算及实验报告的写作方法等,以备查阅。

本教材可作为高等院校生物科学、生物技术专业及农学、林学、医学等相关专业细胞生物学的实验指导用书,也可作为相关学科科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程/王亚男,马丹炜主编. —2 版. —北京:科学出版社,2016.1

ISBN 978-7-03-045503-1

I. ①细… II. ①王…②马… 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 201701 号

责任编辑:刘 丹/责任校对:张怡君

责任印制:赵 博/封面设计:迷底书装

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>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年6月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2016年1月第 二 版 印张:14

2016年1月第一次印刷 字数:332 000

定价:29.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《细胞生物学实验教程》第二版编写成员

主 编 王亚男 马丹炜

副主编 谢保胜 王万军 杨 孔 杨 军 王 煜

编 委 (以姓氏汉语拼音为序)

曹慕岚 (攀枝花学院)

冯 鸿 (成都师范学院)

罗 群 (成都师范学院)

罗 通 (宜宾学院)

马丹炜 (四川师范大学)

马义才 (电子科技大学)

王 煜 (四川师范大学)

王万军 (西南交通大学)

王亚男 (四川师范大学)

伍春莲 (西华师范大学)

谢保胜 (青海大学)

闫秋洁 (绵阳师范学院)

杨 军 (西华师范大学)

杨 孔 (西南民族大学)

张 红 (四川师范大学)

张年辉 (四川大学)

第二版前言

《细胞生物学实验教程》是四川省教育厅 2011 年度“高等教育质量工程”批准立项建设的优秀教材，2014 年入选四川省第二批“十二五”本科规划教材，是四川师范大学精品资源共享课程“细胞生物学实验”的配套教材。本教材第一版自 2010 年出版以来，由于体系新颖，内容全面，适应 21 世纪高等教育改革的需求，在促进高等学校提升细胞生物学实验的教学质量方面起到了积极的作用，被全国多所大专院校广泛使用，受到了教材使用单位广大师生的好评。

现代细胞生物学飞速发展，新知识、新成果、新技术日新月异，与此同时，大专院校的教学改革也要求教材必须紧跟学科发展的步伐，与时俱进，不断更新。为此，我们广泛征求广大师生的意见和建议，对第一版进行了深入细致的分析和总结，结合 5 年来的实践经验对本教材进行了修订。经过修订后的《细胞生物学实验教程》第二版基本保持了第一版的总体框架，与第一版相比，《细胞生物学实验教程》第二版主要对教材中一些不合理的操作步骤进行修订，并增加了部分能够反映细胞生物学学科特点的新技术和新方法。

本书的出版得到了四川省教育厅质量工程建设专项经费的资助和参编单位青海大学、西南交通大学、西南民族大学、西华师范大学、电子科技大学、四川大学、绵阳师范学院、成都师范学院、攀枝花学院等的大力支持，四川师范大学生命科学学院何兵副教授，研究生胡忠良同学、陈斌同学、周健同学在图片处理中提供了无私的帮助，在此一并表示最诚挚的谢意！

由于我们水平有限，修订工作难免存在缺陷，敬请广大读者批评指正！

王亚男 马丹炜

2015 年 6 月于成都

第一版前言

细胞生物学 (cell biology) 是从不同层次 (显微水平、亚显微水平和分子水平) 研究细胞基本生命活动规律的科学。从 1665 年英国学者 Robert Hooke 第一次用自制的显微镜观察软木薄片描述细胞构造伊始, 细胞生物学每一个重大发现或重大突破的获得都是以新技术、新方法的引入作为前提的, 因此细胞生物学是一门实验学科, 实验教学在细胞生物学的整个教学环节中起着举足轻重的作用。

为了适应高校人才培养模式的变化, 我们组织多所大学教学一线的骨干教师, 在多年实验教学和教学改革的基础上, 编写了本教材, 希望本教材的出版能够在提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力方面发挥作用。本教材将实验分为基础性实验、综合性实验和设计性实验 3 种类型。基础性实验是经过精选的、最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术, 使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能, 为综合性实验奠定基础; 综合性实验由多种实验技术和多层次的实验内容所组成, 主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力, 为设计性实验的顺利开展做好准备; 设计性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上, 以相应学科的研究为主, 结合其他学科的知识与技术, 由学生自己设计实验方案, 开展科学研究, 撰写课程研究论文, 使学生得到科学研究的初步训练, 为毕业论文研究工作的开展打下基础。

附录部分附有常用试剂的配制、光学显微镜和电子显微镜的构造和使用方法、器械清洗方法、常用参数换算以及实验报告的写作方法, 以备查阅。在本教材的使用过程中, 各学校可根据自身实验条件和教学目标灵活选取实验内容。

参加本教材编写工作的单位包括四川师范大学、西南交通大学、四川大学、电子科技大学、西华师范大学、西华大学、宜宾学院、四川教育学院、西南民族大学、绵阳师范学院和乐山师范学院。本教材的出版得到了四川师范大学教务处专项经费的资助和各参编单位的大力支持, 在此一并表示最诚挚的谢意!

由于编者水平有限, 教材中难免存在着不足和缺陷, 希望使用本教材的教师、学生和相关科学工作者提出宝贵意见, 以便我们及时修正。

马丹炜

2010 年春

目 录

第二版前言

第一版前言

第一部分 基础性实验

实验 1	普通光学显微镜的使用、细胞的形态观察和大小测定	2
实验 2	暗场显微镜和相差显微镜的使用	12
实验 3	荧光显微镜的使用	18
实验 4	细胞器的活体染色	25
实验 5	细胞内核酸的原位显示	29
实验 6	细胞内蛋白质的定位	32
实验 7	细胞内酶的定位	34
实验 8	细胞内糖类的显示	38
实验 9	细胞内脂类的显示	40
实验 10	酶联免疫吸附测定法	42
实验 11	细胞活性的鉴定	47
实验 12	细胞膜的通透性和巨噬细胞的吞噬活动	50
实验 13	细胞凝集反应	54
实验 14	果蝇唾腺细胞巨大染色体的观察	56
实验 15	细胞的减数分裂	59

第二部分 综合性实验

实验 16	常用显微镜制片技术	64
实验 17	细胞骨架的光学显微镜观察	73
实验 18	动物骨髓细胞染色体标本的制备	79
实验 19	人外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备	82
实验 20	植物细胞染色体标本的制备	86
实验 21	显示染色体核仁组织区的银染色法	88
实验 22	荧光原位杂交技术定位端粒序列	91
实验 23	细胞器的分离和鉴定	94

实验 24	动物细胞培养	98
实验 25	细胞增殖能力的检测——集落形成实验	106
实验 26	MTT 比色法检测细胞存活状态	109
实验 27	培养细胞生长状态评价——有丝分裂指数和生长曲线测定	111
实验 28	细胞同步化	114
实验 29	流式细胞术测定细胞周期	117
实验 30	动物细胞融合	120
实验 31	植物原生质体的分离、融合和培养	124
实验 32	细胞转染技术	128

第三部分 设计性实验

实验 33	完整叶绿体的分离、纯化及观察	132
实验 34	逆境对植物细胞膜系统的损伤和破坏	136
实验 35	植物细胞悬浮培养	138
实验 36	单细胞凝胶电泳试验检测细胞 DNA 损伤	140
实验 37	环境有害物质对微核的诱导和检测	144
实验 38	细胞凋亡的诱导和检测	147
实验 39	植物次生代谢物质对肿瘤细胞增殖的影响	152

第四部分 附录

附录 I	常用染料简介和常用染色剂配方	156
附录 II	细胞生物学实验常用缓冲液的配制	165
附录 III	细胞生物学实验常用培养基的配制	172
附录 IV	常用生物固定液	178
附录 V	封片剂和粘贴剂	184
附录 VI	光学显微镜的维护	185
附录 VII	电子显微镜技术	187
附录 VIII	器械的清洗与消毒	193
附录 IX	实验室常用技术参数	196
附录 X	常用植物激素、抗生素的配制	202
附录 XI	部分动物、植物及人的染色体数目	203
附录 XII	撰写细胞生物学实验报告的要求	204

参考文献	212
------------	-----

实验 1 普通光学显微镜的使用、 细胞的形态观察和大小测定

光学显微镜是生物学研究不可缺少的工具，其利用光学成像原理把肉眼观察不到的物体放大几百倍甚至上千倍，使研究者能够对生物体的很多细微结构进行观察和研究，把人们的视觉从宏观引向微观，促成了细胞学和微生物学等学科的创立。

普通光学显微镜的构造主要由机械装置、光学部分和光源部分三部分组成（图 1.1）。

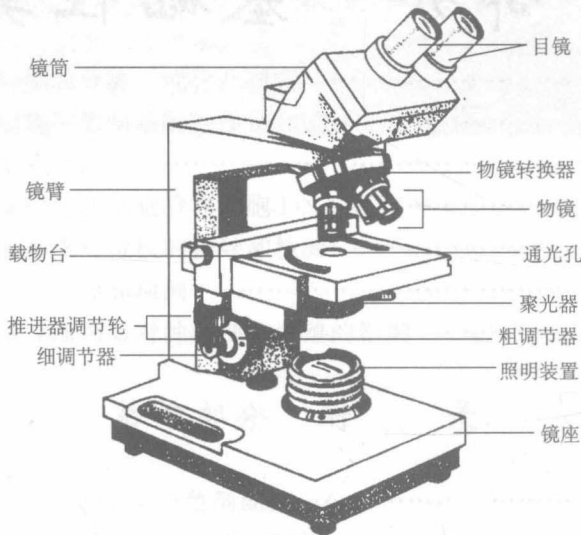


图 1.1 显微镜的结构示意图（改自杨继，2000）

机械装置是用于光学系统的支承和运动，并通过它调节光学系统的正确位置。机械装置包括以下部分：镜座（base）是位于最底部的构造，为整个显微镜的基座，起稳固作用以支持着整个镜体。大部分光学显微镜的镜座上安装有光源。镜柱上方弯曲的弓形部分叫做镜臂（arm），一端连于镜柱，一端连于镜筒，是取放显微镜时手握的部位。镜筒（light tube）是物镜与目镜之间的金属筒，为光学通路，上端装载目镜，下端连接物镜转换器。根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种，镜筒直立式光镜的目镜与物镜的光轴在同一直线上，而镜筒倾斜式光镜的目镜与物镜的中心线互成 45° 角，在镜筒中装有使光线转折 45° 的棱镜，现代光学显微镜大多为镜筒倾斜式，双筒式光镜的镜筒均为倾斜式的。从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。物镜的放大率是对一

定筒长而言，镜筒长度的变化会导致放大倍率和成像质量发生变化，因此不能随意改变显微镜镜筒长度，国际上将镜筒长度标准定为 160 mm，此数字标在物镜的外壳上面。物镜转换器 (nosepiece) 位于镜筒下端，是一个可以转动的圆盘，一般有 2~4 个物镜接口用以安装放大倍数不同的物镜。变换物镜可以通过旋转物镜转换器，当旋至物镜和镜筒成直线时，就发出“咔”的响声，方可观察玻片标本。载物台 (stage) 也称镜台，是位于镜臂下面的平台，用以放置玻片标本。载物台中央有一圆形的通光孔，来自聚光器的光线可以通过它由下向上照到标本上。载物台上一般装有标本推进器 (推片器)，由位于载物台的后方和侧面边缘的一横一纵 2 个推进齿轴金属架构成，金属架杆上刻有标尺，构成了紧密的平面坐标系。如果需要重复观察已经检查标本的某一部分，在第一次检查时记下纵横标尺的数值，以后按照数字移动推进器即可找到原来标本的位置。载物台上方或下方一侧有两个旋鈕，为推进器调节轮，可使玻片标本做左右、前后方向的移动。标本推进器上有纵横游标尺，用以测定标本在视野中的方位及其大小。游标尺一般由主标尺 (A) 和副标尺 (B) 组成。副标尺的分度为主标尺的 $9/10$ 。使用时，首先看副标尺的 0 点位置。然后看主、副标尺的一致点。如图 1.2 所示，副标尺的 0 点在主标尺的 26 与 27 之间，副标尺的 6 与主标尺的 32 一致，即 6 与主标尺上的一个分度线正对，则此标尺所表示的数值为 26.6 mm；推进器左侧有弹簧夹，用以夹持玻片标本。调焦螺旋 (focus adjustment) 也称调节器，为调节焦距的装置，分粗调节器 (大螺旋) 和细调节器 (小螺旋) 两种。粗调节器可使镜筒或镜台做较快或较大幅度的升降，能迅速调节好焦距。粗调焦旋钮每旋转一圈可使载物台或镜筒升降 10 mm，适于低倍镜观察时调焦。细调焦旋钮每旋转一圈可使载物台或镜筒升降 0.1 mm (100 μm)，适用于在低倍镜下用粗调节器找到物体后，在高倍镜和油镜下进行焦距的精细调节，以此对物体不同层次、深度的结构做细致的观察。现代显微镜的粗调焦螺旋和细调焦螺旋多采用共轴式结构，并有锁定装置避免物镜因接触到玻片标本而受损。

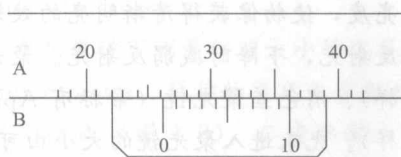


图 1.2 游标尺的用法

普通光学显微镜的光学部分包括物镜 (objective lens)、目镜 (ocular lens)、聚光器 (condenser) 和滤光片 (light filter) 等。物镜是装在物镜转换器上的一组镜头，是显微镜最重要的光学部件，它决定了显微镜像的质量、分辨率和放大倍数。由于物镜靠近被观察的物体，故又称为接物镜。按照放大倍数，物镜一般分低倍镜、高倍镜和油镜。通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数和数值孔径 (镜口率) (如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.30 等)、镜筒长度和所要求的盖玻片厚度 (如 160mm/0.17mm)。随着放大倍数的增加，物镜镜体长度增加 (在镜体上刻有数字，低倍镜一般有 4 $\times$ 、10 $\times$ ，高倍镜一般有 40 $\times$ ，油镜一般是 90 $\times$ 、100 $\times$ ， $\times$ 表示放大倍数)。不同倍数物镜的技术参数见表 1.1，不同厂家略有差异。

普通光学显微镜的光学部分包括物镜 (objective lens)、目镜 (ocular lens)、聚光器 (condenser) 和滤光片 (light filter) 等。物镜是装在物镜转换器上的一组镜头，是显微镜最重要的光学部件，它决定了显微镜像的质量、分辨率和放大倍数。由于物镜靠近被观察的物体，故又称为接物镜。按照放大倍数，物镜一般分低倍镜、高倍镜和油镜。通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数和数值孔径 (镜口率) (如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.30 等)、镜筒长度和所要求的盖玻片厚度 (如 160mm/0.17mm)。随着放大倍数的增加，物镜镜体长度增加 (在镜体上刻有数字，低倍镜一般有 4 $\times$ 、10 $\times$ ，高倍镜一般有 40 $\times$ ，油镜一般是 90 $\times$ 、100 $\times$ ， $\times$ 表示放大倍数)。不同倍数物镜的技术参数见表 1.1，不同厂家略有差异。

用低倍镜和高倍镜时，标本与物镜之间的介质是空气。用油镜时，两者之间的介质必须使用香柏油或液体石蜡，香柏油的折射率和玻璃的折射率大致相同。目镜(ocular lens)装在镜筒上端，其功能是将物镜形成的中间像进一步放大，并矫正物镜余下的像差和色差，使之便于观察，但不能提高显微镜的分辨率。目镜通常由2块透镜组成，上端的透镜称为接目镜(eye piece)，下端的透镜称为场镜(field piece)，在接目镜和场镜之间或场镜下端设有金属光阑——视场光阑，以限制视野去掉周边的模糊像，光阑的位置就是物镜所放大的实像位置，可在其上面安装指示针(用以指示要观察的某一部分)或目微尺。目镜上一般刻有放大倍数(如5×，10×)。有些目镜上具有标志，代表了目镜的类型，如补偿目镜(K或C)、摄影目镜(P)、平场目镜(Plan)等。显微镜对实物总的放大倍数由目镜、物镜和镜筒长度共同决定。镜筒长度一般为160 mm(少数为170 mm)。物体最后被放大的倍数为目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积，如物镜是40×，目镜是10×，则物体最后放大倍数为40×10=400×；聚光器(condenser)位于载物台下方，是光学显微镜光学系统中一个重要的组成部分，由聚光透镜、孔径光阑和升降螺旋组成。聚光透镜的功能是将从光源射来的光线汇集成束投射到所要观察的标本上，增强视野的亮度，使物像获得清晰明亮的效果；聚光器的高低由升降螺旋调节，往上升时增强反射光，下降时减弱反射光。聚光器有3种类型：阿贝氏聚光镜(常标有Abbe字样)、消色差聚光镜(常标有Aplant字样)和消球差聚光器(常标有Achromat字样)。光束进入聚光镜的大小由可变光阑——孔径光阑(aperture diaphragm)来控制。孔径光阑又称光圈，是在聚光镜底部的一个圆环状结构，装有多片半月形的薄金属片，叠合在中央成圆孔形。在圆环外缘有一突起的小柄，拨动它可使金属片分开或合拢，以改变照明光束的直径，调节进光量，改变视野的明暗和反差，使物像更为清晰；用显微镜观察标本或进行摄影时，往往需要选择某一波段的光线，而排除不需要的光线。滤光片(light filter)起着选择光线的作用，改变从光源射来的各种光线的组成，提高分辨率，增强反差，或在彩色照相时调剂色温。由于短波光分辨率较高，因此通常采用蓝色滤光片；为了观察清楚，减少视觉疲劳，常用互补色，如红-青、绿-红、蓝-黄等；为了减少色差，可用单色光，一般采用绿、黄绿光对眼睛最适宜。

表 1.1 不同倍数物镜的比较 (章静波等, 2006)

镜头	放大倍数	镜身	数值孔径	工作距离/mm
低倍镜	10×	短	0.3	7
高倍镜	40×	较长	0.5	0.5
油镜	100×	长	1.3	0.2

注：表中的工作距离是指显微镜处于工作状态(物像调节清楚)时，物镜的下表面与盖玻片(盖玻片的厚度一般为0.17 mm)上表面之间的距离，物镜的放大倍数越大，其工作距离越小

普通光学显微镜的光源部分包括光源系统反光镜 (mirror) 和显微镜镜灯 (lamp)。反光镜是普通光学显微镜的取光设备, 是装在载物台下面、镜柱前方的一面可转动的圆镜, 它有平凹两面。平面镜聚光力弱, 适合光线较强时使用。凹面镜聚光力强, 适于光线较弱时使用。转动反光镜, 可将光源反射到聚光镜上, 再经镜台中央圆孔照明标本。目前许多类型的显微镜都采用人工光源, 即内置式灯光照明, 不再需要反光镜; 显微镜镜灯是一种人工光源, 分外光源和内光源。内光源是安装在镜座内的照明装置, 光束直接射向聚光镜, 或经底座内部的反射装置折入聚光镜。光线的强弱由镜座上的光亮调节旋钮控制。

显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数与目镜的放大倍数的乘积, 如物镜为 $10\times$, 目镜为 $10\times$, 其放大倍数就为 $10\times 10=100$ 。

细胞是生命活动的基本结构单位 and 功能单位。多细胞生物体内有不同类型的细胞, 其形态、大小差异较大, 人和动物细胞直径一般为 $10\sim 20\text{ }\mu\text{m}$, 一般植物细胞的大小为几十微米, 很难用肉眼观察, 因此, 需借助于显微镜才能观察到细胞内部结构。一般光学显微镜最大分辨率为 $0.2\text{ }\mu\text{m}$, 细胞内的一些结构如线粒体、质体、高尔基体、中心体、核仁、染色体等都大于 $0.2\text{ }\mu\text{m}$, 能在光镜下观察到, 通常把在光镜下所见到的结构称为显微结构 (microscopic structure)。

细胞大小测量是研究细胞的基本方法之一。在显微镜下测量细胞大小的工具是显微测微尺。显微测微尺由物镜测微尺 (stage micrometer, 简称物微尺或台微尺) 和目镜测微尺 (ocular micrometer, 简称目微尺) 组成 (图 1.3), 二者要配合使用。目镜测微尺是一个可以放在目镜内的一直径为 2 cm 特制圆玻片, 其上有 50 或 100 等分格的刻度尺。每一小格表示的长度随着不同显微镜、不同放大倍数的物镜而异; 物镜测微尺为一特制载玻片, 中央贴一圆形盖玻片封固着一具有精细刻度的标尺, 标尺长度为 1 mm , 等分为 100 格, 每格长 0.01 mm ($10\text{ }\mu\text{m}$), 标尺的外围有一小黑圈。目微尺测量的是细胞经过物镜放大后的像, 因而每格所代表的实际长度随着物镜的放大倍率而变化。因此当测量细胞大小时, 需要先用物微尺标定目微尺每一格所代表的实际长度, 然后移去物微尺, 换上待测标本, 再测定细胞大小, 而不能用目镜测微尺直接测量细胞。

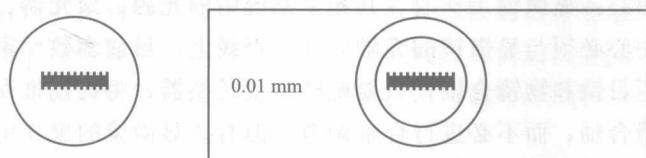


图 1.3 目微尺和物微尺的外观形态 (辛华, 2004)

目前, 显微互动设备广泛用于细胞生物学实验教学。利用校准片配合显微数码互动系统中的测量软件, 不但可以测量细胞的大小, 而且可以测量细胞的周长和面积等。该系统中所用的校准片即上述的台微尺。

【实验目的】

- (1) 理解普通光学显微镜的机械系统和光学系统的结构组成及其工作原理，熟练掌握普通光学显微镜的使用方法。
- (2) 认识光学显微镜下细胞的各种形态结构。
- (3) 掌握测微尺的基本原理、安装和使用方法。

【材料、器材和试剂】

材料：人体口腔上皮细胞 (epithelial cell)、洋葱 (*Allium cepa* Linn.) 鳞茎。

器材：普通光学显微镜、显微测微尺 (物镜测微尺和目镜测微尺)、擦镜纸、刀片、载玻片、盖玻片、牙签、吸水纸。

试剂：无水乙醇、香柏油、1%碘液、1%甲苯胺蓝。

【实验方法和步骤】

1. 显微镜的使用

1) 显微镜观察前的准备工作

使用显微镜前，将显微镜放置在身体左前方的实验台上，镜座应距桌沿 10 cm 左右。先检查显微镜的各个部分是否完整和正常，并对载物台、目镜、物镜和聚光镜进行必要的清洁工作，然后进行必要的调整。

对光：用左手转动粗调螺旋使镜筒上升或载物台下降，然后转动物镜转换器使低倍镜对准载物台的通光孔 (转动时应注意使物镜上方的缺刻与基座的固定扣相扣合，当转动到听见“咔”声响，或同时亦感到有阻力时立即停止转动，说明物镜已与镜筒成一直线)；拨动聚光器孔径光阑的小柄，使光阑完全打开；旋转聚光器升降螺旋，使聚光器上端透镜平面稍低于载物台平面的高度，转动反光镜，使视野内的光达到完全均匀明亮；自带光源的显微镜，可通过调节电流旋钮调节光照的强弱。

调节光轴中心：显微镜工作时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须与显微镜的光轴同在一直线上。目前多数厂家的显微镜在设计上已经保证了目镜和物镜合轴，只要旋转物镜转换器，将物镜推到工作位置便能使目镜和聚光镜合轴，而不必进行合轴调节。但有些显微镜的聚光镜可以升降和水平移动，就必须调节聚光镜中心对正光轴。具体操作步骤为：先将光阑缩小，用 10×物镜观察，在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像，如果此像不在视场中央，可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央，然后缓慢地将视场光阑打开，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接，说明光线已经合轴。

2) 低倍镜的使用

低倍镜视野较大, 容易发现目标和确定检查的位置, 因此镜检标本时, 需先用低倍镜进行观察。其操作步骤如下。

放置玻片标本: 将玻片标本放在载物台上(注意: 有盖玻片的一面朝上), 用标本夹夹住, 然后转动推进器螺旋, 把要观察的标本部位对准通光孔的中心。注意: 载物台上的刻度可以标示玻片的坐标位置。

调节焦距: 转动粗调螺旋, 使低倍镜距玻片标本 $<6\text{ mm}$ (调节时必须从侧面注视物镜与玻片的距离, 切勿用眼在目镜上观察的同时就转动粗调螺旋, 以防镜头碰撞玻片造成损坏), 然后慢慢转动粗调螺旋, 使镜头上升或使载物台下降, 直至视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心, 可用推进器前后左右移动玻片标本位置(注意: 玻片移动方向与观察物像移动的方向相反)。如果在调节焦距时, 镜头和标本片的距离已超过工作距离而未见到物像, 则应严格按上述步骤重新操作。

3) 高倍镜的使用

用低倍镜找到要观察的标本物像后, 把要放大的部分移至视野正中, 同时调节到最清晰程度后转换高倍镜镜检, 步骤如下。

转动物镜转换器: 慢慢转动物镜转换器, 并从侧面进行观察(防止高倍镜碰撞玻片), 使高倍镜转到载物台通光孔处。较好显微镜的低倍镜和高倍镜是同焦的, 在正常情况下, 高倍镜的转换不会碰到载玻片或其上的盖玻片, 如果高倍镜碰到玻片, 应检查原因(如低倍镜的焦距没有调节好、玻片放反或物镜松动)后重新进行操作。

调节焦距: 正常情况下直接转换高倍镜即可见到视野中有不太清晰的物像, 用细调螺旋慢慢向上或向下转动(切勿用粗调螺旋)即能清楚看到物像, 一般只需转动半圈或一圈就能达到要求。将需要观察的部位移到视野中央进行观察。

4) 油镜的使用

油浸物镜的工作距离很短, 一般在 0.2 mm 以内, 使用油镜时要特别细心, 避免由于调焦不慎而压碎玻片标本甚至导致物镜受损。

(1) 在高倍镜下找到所要观察的标本后将需要观察的部分移至视野中央。

(2) 转动物镜转换器移开高倍镜, 在标本上所要观察的位置加1滴香柏油作为介质, 转动物镜转换器转换油镜, 从侧面注视, 使油镜对准载物台的通光孔处, 并浸入香柏油中。

(3) 用眼观察目镜, 同时放大视场光阑和聚光器的光圈, 上调聚光器, 使光线充分照明。小心地转动细调螺旋使镜头微微上升或下降载物台, 直到出现清晰的物像。物像如不清楚, 可用细调螺旋慢慢向上或向下转动, 即能清楚地看到物像。如仍看不清标本, 需重新用低倍镜、高倍镜观察, 然后再转换油镜。

(4) 观察完毕, 下降载物台, 将油镜转离光轴, 用擦镜纸细心、轻柔擦拭油

镜,不可用力过猛。擦拭程序为先用擦镜纸擦1~2次,擦去大部分镜油,再用擦镜纸蘸少许二甲苯或乙醚乙醇混合液(乙醚:纯乙醇=2:3)擦去油镜头上残留的油迹,最后用干净擦镜纸擦1次;如果聚光器上具有油滴,按同样方法处理;注意顺着镜头直径方向擦拭,不可沿着镜头圆周擦拭;将1张干净的擦镜纸盖在玻片标本的油上,然后在纸上滴上1~2滴二甲苯,轻拉擦镜纸,重复3~4次即可将玻片上的镜油擦去。注意勿擦坏标本。

2. 细胞形态的观察

1) 口腔黏膜上皮细胞的观察

口腔黏膜细胞涂片标本的制备:吸取1滴碘液或甲苯胺蓝溶液滴在一张洁净的载玻片中央,用1根消毒牙签伸入自己的口腔内壁轻轻刮取黏膜上皮细胞(或在舌头表面刮取细胞),然后将其放入载玻片上的染液中并来回搅动使细胞散开;染色1 min左右后小心加盖玻片(尽量避免产生气泡),用滤纸吸去盖玻片周围的液体。

观察:将自制的口腔上皮细胞标本片置于显微镜下观察,先用低倍镜观察较分散的、轮廓清晰的上皮细胞。由于该细胞体积较小、着色较淡,观察时应稍降低视野亮度以便于较快找到目标(在低倍镜下,用碘液染色的细胞呈黄色,用甲苯胺蓝染色的细胞呈淡蓝色,成群或分散分布,形态大小多呈扁平椭圆形)。选择轮廓清晰的细胞移至视野中央,转换至高倍镜下观察。在高倍镜下,可见口腔黏膜细胞外围有一层薄薄的细胞膜,扁圆形的细胞核呈深黄色(碘液染色时)或深蓝色(甲苯胺蓝染色时),细胞质成浅黄色或浅蓝色;核中央致密的结构为核仁。

2) 洋葱鳞茎内表皮细胞的观察

表皮细胞装片标本的制备:取一干净载玻片,在中央滴1滴碘液,将洋葱鳞茎用小刀分为几块,取一块肉质鳞叶,用刀片在内表皮划“田”字形小方格,每一小方格边长3~4 mm,然后用镊子轻轻撕下一小方格的膜质表皮,置于载玻片的碘液滴中铺平,取一干净的盖玻片,将其一侧先接触标本旁的碘液,再缓缓地盖上盖玻片,尽量避免产生气泡,用吸水纸吸去盖玻片周围的液体。

观察:将制备好的装片标本放到显微镜下,先用低倍镜观察,可见许多长柱状、排列整齐、彼此相连的细胞,选择其中一个典型的细胞移至视野中央,再转换至高倍镜下仔细观察细胞壁、细胞核、细胞质和液泡等结构。

3. 细胞大小的测定

1) 利用显微测微尺测量

(1) 将显微镜的目镜抽出,除去上面的接目镜,小心地将目微尺(有刻度的一面朝下)放入目镜筒中。

(2) 在目镜下观察目镜测微尺的刻度是否清楚,如不清楚,说明目镜测微尺不在视野光的焦平面上,需要重新调整,以便清晰地见到玻璃圆片上的间隔。

(3) 将物微尺(刻度朝上)置于载物台上,使分格位于视野中间,调准焦点可见许多分隔,使两种测微尺平行起点线重合,然后找出另一处两尺重合处,记录起

点线到重合线之间格尺的刻度数（格数），按式 1.1 计算在该放大系统下目镜测微尺每格所代表的实际长度（图 1.4）。

目微尺每格所代表的实际长度(μm) = 物微尺格数 / 目微尺格数 × 10(μm) (1.1)

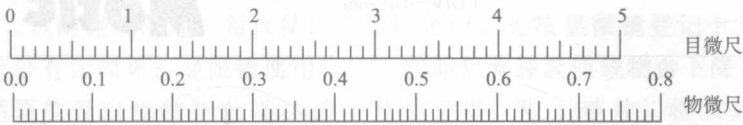


图 1.4 物微尺和目微尺的使用示意图（李芬，2007）

(4) 移去物微尺，换上玻片标本，使得测定的部分位于视野中央，观察测定对象的长度相当于目镜测微尺的几倍。然后将所测知的格数乘以目镜测微尺每格的长度，即为所测标本的长度。

(5) 测量结果计算。

椭圆形: $V = \frac{4\pi ab^2}{3}$ (1.2)

球形: $V = \frac{4\pi R^3}{3}$ (1.3)

圆柱形: $V = \pi R^2 h$ (1.4)

核质比: $NP = \frac{V_n}{V_c - V_n}$ (1.5)

式中， V 为体积； R 为半径； a 为半径； b 为短半径； NP 为核质比； V_n 为核体积； V_c 为细胞体积。

2) 利用 Motic Diglab II 软件系统测量

(1) 点击 Motic Diglab II 软件菜单栏“系统”中选择“动态测量”（图 1.5）。

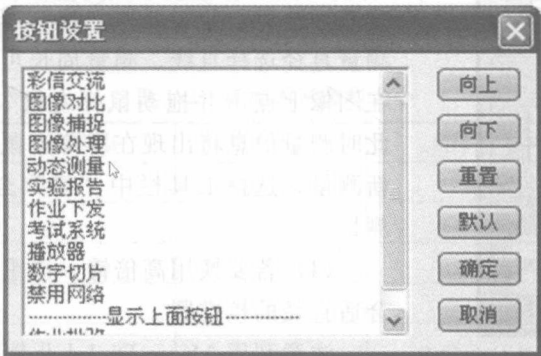


图 1.5 Motic Diglab II 软件菜单栏中的动态测量对话框