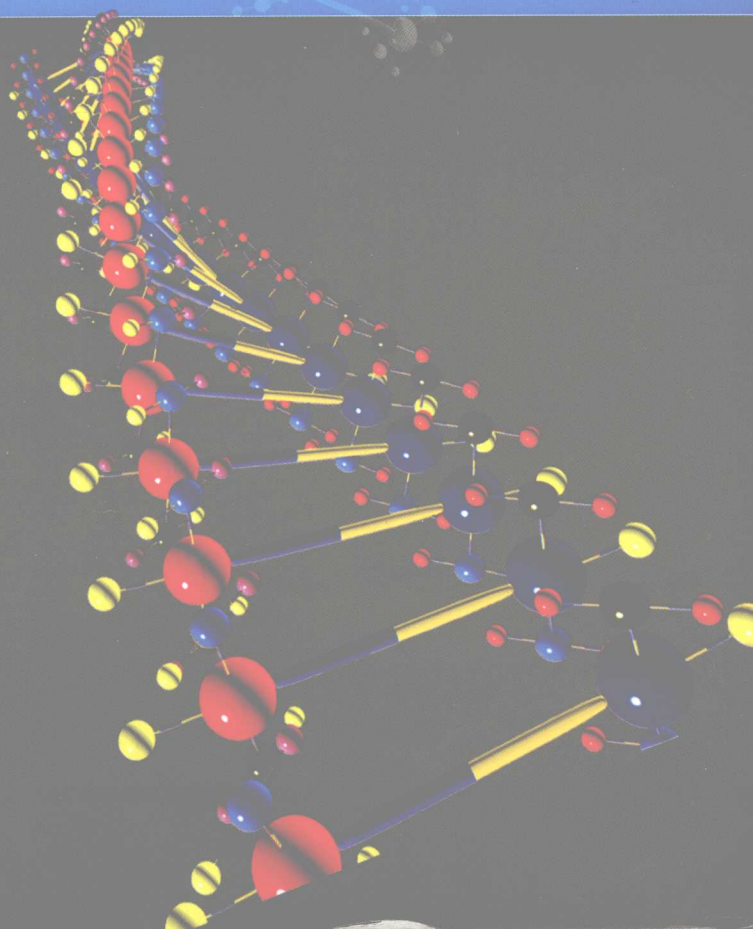


高等学校实验教材

细胞生物学 实验指导

主编 / 秦志峰



高等学校实验教材

细胞生物学 实验指导

主 编 秦志峰

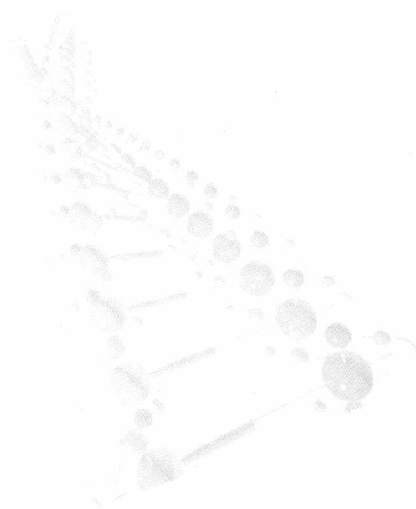
副主编 李国庆 易 岚 贺庆芝

编 者 (按姓氏笔画排序)

刘运莲 李国庆 杨露青

易 岚 贺庆芝 秦志峰

殷 杰 曹红峰



图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验指导/秦志峰主编. —长沙: 湖南科学技术出版社, 2008.5

ISBN 978-7-5357-5277-2

I. 细… II. 秦… III. 细胞生物学—实验 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 056406 号

高等学校实验教材

细胞生物学实验指导

主 编: 秦志峰

责任编辑: 陈一心

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 276 号

<http://www.hnstp.com>

印 刷: 衡阳博艺印务有限责任公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 湖南省衡阳市黄茶岭光明路 21 号

邮 编: 421008

出版日期: 2008 年 5 月第 1 版第 1 次

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 7

字 数: 162000

书 号: ISBN 978-7-5357-5277-2

定 价: 15.00 元

(版权所有 翻印必究)

目 录

细胞生物学实验室规则	(1)
实验一 普通光学显微镜的构造与使用	(3)
实验二 特殊显微镜的原理和使用	(11)
实验三 光学显微标本的制作技术	(16)
实验四 细胞的基本形态与结构	(24)
实验五 细胞的化学成分	(27)
实验六 线粒体和液泡系的超活染色与观察	(31)
实验七 叶绿体的分离与荧光观察	(35)
实验八 线粒体的分离与观察	(37)
实验九 细胞器的分离	(40)
实验十 细胞有丝分裂	(46)
实验十一 生殖细胞减数分裂	(51)
实验十二 动物染色体标本的制备与观察	(58)
实验十三 染色体核仁组织区的银染色法	(61)
实验十四 动物细胞培养——原代细胞培养	(63)
实验十五 动物细胞培养——传代细胞培养	(72)
实验十六 动物细胞的冻存、复苏与运输	(77)
实验十七 鸡血细胞的体外融合	(80)
实验十八 细胞电融合	(83)
实验十九 膜蛋白质的分离	(87)
实验二十 脂质体的制备	(93)
实验二十一 凋亡细胞的生化分析	(96)
实验二十二 诱变物质的微核测试	(98)
实验二十三 细胞电泳	(100)
参考文献	(104)

细胞生物学实验室规则

一、细胞生物学实验要求

(1) 学生在课前应认真预习实验指导,明确实验目的、要求和注意事项,熟悉实验内容、操作方法和基本原理,并写出简要的实验程序。

(2) 上实验课时必须携带实验教材和完成实验报告的文具,穿好工作服进入实验室,按指定坐位入座。

(3) 做实验前要认真检查所用仪器、试剂等是否完好齐全,如有缺损应及时向任课教师报告,自己不得随意调换仪器、标本等。

(4) 为了培养学生独立工作和思考的能力,学生应严格按照实验教材的要求独立进行操作,教师只限于讲解实验内容的安排及注意事项,使学生有充裕的时间进行独立操作和观察。

(5) 实验应由学生独立进行。学生在实验中要根据实验教材要求精确观察,认真地记录事实。有关基本技能的训练,必须严格按照实验要求的操作程序进行,反复练习,务必切实掌握并达到一定的熟练程度。操作和观察应认真细心,自觉养成一丝不苟的科学作风,力求做到严肃、严格、严密。

(6) 实验结束后,要根据自己的观察、记录和结果,实事求是地撰写实验报告或认真完成作业,不得抄袭教材或其他同学的报告。实验报告或作业应于实验室完成。它的形式可因实验内容而不同,基本包括文字报告、公式计算、绘图和列表等。

二、实验室规则和注意事项

(1) 每个学生必须严格遵守实验室规则。实验时不得迟到、早退或无故缺席,有病或有事向任课教师请假。

(2) 进入实验室后要求做到安静,不得在室内喧哗、打闹;不得吸烟、吃东西、随地吐痰、乱扔纸屑和其他杂物;不得将与实验无关的物品带入实验室;不得将实验物品带出实验室;不得在实验台和仪器上乱涂乱画,未经许可不得操作、拨弄仪器设备。

(3) 要爱护仪器、标本和设备,使用仪器时要精心,严格遵守操作规程,因违反操作规程而损坏仪器设备及物品者要按有关规定赔偿。

(4) 在实验程中仪器设备发生故障或损坏时,应首先切断电源,并立即报告任课教师及时处理。

(5) 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂及传染性强的物质时, 应严格操作, 注意自我保护。如发生意外应立即报告任课教师及时处理。

(6) 实验完成后, 将仪器设备、用具等放归原处, 所用器皿处理干净。值日生负责清扫室内卫生, 关好水、电开关和窗户, 经任课教师检查后, 方可离开实验室。

三、实验报告的书写

实验报告是对该次实验观察、比较或结果的真实记载, 是科学的记录。实验报告的形式可根据实验内容的不同而分为文字描述、绘图和列表 3 种形式。

1. 文字描述

文字描述是将观察所得或实验结果客观地加以描述, 有时还需要做进一步分析。在此过程中, 要抓住主要问题, 描述准确, 条理清楚, 文字简明。

2. 绘图

绘图是细胞生物学实验报告的一种重要形式, 是将所观察标本的形态结构通过作图的方式来表达。

为了正确记录观察结果、加深印象、便于复习, 现将绘图方法和注意事项说明如下:

(1) 每个学生应在实验课前准备好 2H、HB 黑色铅笔各一支及橡皮、直尺 (或三角尺)、削笔刀。

(2) 绘图必须真实正确, 整洁明了, 各部分比例应与标本一致。认真观察标本后, 方可绘图, 不得潦草, 更不能抄袭教材或他人的图。

(3) 只在绘图纸的一面绘图, 每幅图的大小、位置必须分配适宜, 布局合理。图的位置一般偏于纸的左侧, 右侧作引线及注字。一般较大的图每页绘一个, 较小的图每页绘数个。

(4) 铅笔尖应经常保持尖锐。绘图时, 先用 HB 软铅笔把标本轮廓及主要部分轻轻绘出, 然后添加各部分详细结构, 再加以修改, 确定与所描绘的标本准确无误后, 再用尖的 2H 硬铅笔以清晰的笔画绘出全图。

(5) 用线条表示图的范围, 点的疏密表示淡浓, 线条要均匀, 点要圆润。

(6) 绘图纸上所有的字必须用硬铅笔以楷书写出, 不可潦草。注字引线应水平伸出, 各引线不能交叉, 图的名称应写在该图的下面。

实验一 普通光学显微镜的构造与使用

一、实验目的

- (1) 了解普通光学显微镜的构造及成像原理。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。
- (3) 初步了解光学显微镜的维护方法。

二、实验原理

普通光学显微镜是最通用的一种光学显微镜。利用光线照明，标本中各点依其光吸收的不同而在明亮的背景中成像。它由物镜、目镜、聚光镜、光源、载物台和支架等部件组成。其基本成像原理是：目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜，被检标本置于聚光器与物镜之间，物镜可使标本在物镜的上方形成一个倒立的放大实像（倒像）。目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上，形成一个直立的实像（正像）。显微镜中放大的倒立的虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的，该虚像看起来好像在离眼睛 250mm 处（图 1-1）。

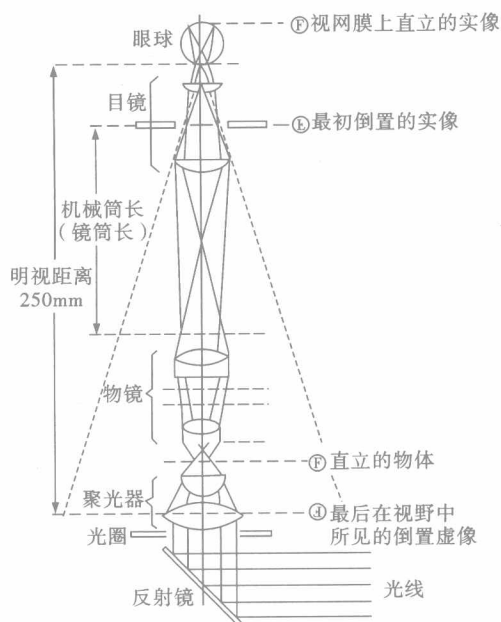


图 1-1 光学显微镜的放大原理及光路图 (引自王金发等, 2004)

三、实验仪器、材料和试剂

普通光学显微镜、擦镜纸、文字装片或毛发装片、血涂片、镜头清洗剂、香柏油或油镜专用油等。

四、方法与步骤

(一) 普通光学显微镜的基本构造

光学显微镜主要由三部分组成：机械部分、光学部分和照明部分（图 1-2）。

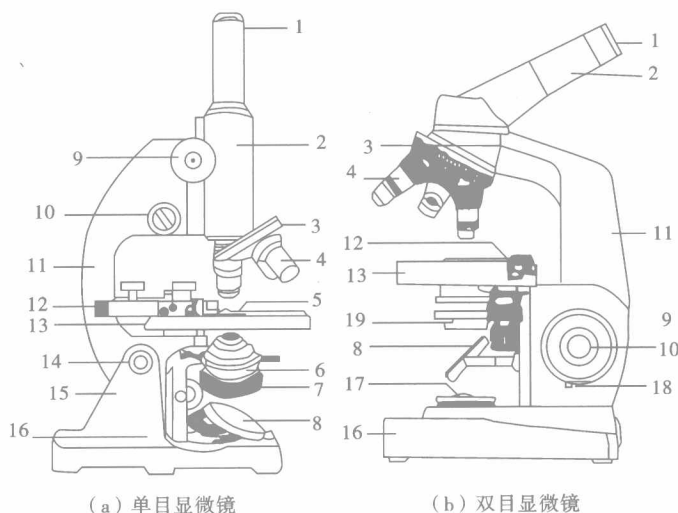


图 1-2 普通光学显微镜的结构示意图（引自章静波等，2004）

1—目镜；2—镜筒；3—物镜转换器；4—物镜；5—通光孔；6—聚光器；7—光圈；8—反光镜；9—粗调节器；10—细调节器；11—镜臂；12—移片器；13—载物台；14—倾斜关节；15—镜柱；16—镜座；17—照明装置；18—粗调限位环凹柄；19—滤光片

1. 机械部分

显微镜的机械部分是显微镜的重要组成部分。其作用是固定与调节光学镜头，固定与移动标本等。主要由镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器与调焦装置等组成。

(1) 镜座：作用是支撑整个显微镜，装有反光镜，有的还装有照明光源。

(2) 镜柱：镜座上面直立的短柱，连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂：作用是支撑镜筒和载物台。分固定、可倾斜两种。

(4) 镜筒：镜筒上端放置目镜，下端连接物镜转换器。分为固定式和可调节式两种。机械筒长（从目镜管上缘到物镜转换器螺旋口下端的距离称为镜筒长度或机械筒长）不能变更的叫做固定式镜筒，能变更的叫做调节式镜筒，新式显微镜大多采用固定式镜筒，国产显微镜也大多采用固定式镜筒，国产显微镜的机械筒长通常是 160mm。

安装目镜的镜筒，有单筒和双筒两种。单筒又可分为直立式和倾斜式两种，双筒则都是

倾斜式的。其中双筒显微镜，两眼可同时观察以减轻眼睛的疲劳。双筒之间的距离可以调节，而且其中有一个目镜有屈光度调节（即视力调节）装置，便于两眼视力不同的观察者使用。

(5) 载物台（又称工作台、镜台）：

载物台作用是安放载玻片，形状有圆形和方形两种，其中方形的面积为 $120\text{mm} \times 110\text{mm}$ 。中心有一个通光孔，通光孔后方左、右两侧各有一个安装压片夹用的小孔。分为固定式和移动式两种。有的载物台的纵横坐标上都装有游标尺，一般读数为 0.1mm ，游标尺可用来测定标本的大小，也可用来对被检部分做标记。

(6) 物镜转换器：

物镜转换器固定在镜筒下端，有 $3 \sim 4$ 个物镜螺旋口，物镜应按放大倍数高低顺序排列。旋转物镜转换器时，应用手指捏住旋转碟旋转，不要用手指推动物镜，因为时间长容易使光轴歪斜，使成像质量变坏。

(7) 调焦装置：

显微镜上装有粗调节器（粗准焦螺旋）和细调节器（细准焦螺旋）。有的显微镜粗准焦螺旋与细准焦螺旋装在同一轴上，大螺旋为粗准焦螺旋，小螺旋为细准焦螺旋；有的则分开安置，位于镜臂的上端较大的一对螺旋是粗准焦螺旋，其转动一周，镜筒上升或下降 10mm 。位于粗准焦螺旋下方较小的一对螺旋为细准焦螺旋，其转动一周，镜筒升降值为 0.1mm ，细准焦螺旋调焦范围不小于 1.8mm 。

2. 照明部分

安装在载物台下方，包括反光镜、聚光镜、光圈。

(1) 反光镜：反光镜是一个可以随意转动的双面镜，一面为平面，一面为凹面，其作用是将任何方向射来的光线经通光孔反射上来。平面镜反射光线的能力较弱，是在光线较强时使用，凹面镜反射光线的能力较强，是在光线较弱时使用。观察完毕后，应将反光镜垂直放置。

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) 聚光器：聚光器也叫集光器。位于标本下方的聚光器支架上。它主要由聚光镜和光圈组成。

其中，聚光镜可分为明视场聚光镜（普通显微镜配置）和暗视场聚光镜。

数值孔径（ $N \cdot A$ ）是聚光镜的主要参数，最大数值孔径一般是 $1.2 \sim 1.4$ ，数值孔径有一定的可变范围，通常刻在上方透镜边框上的数字是代表最大的数值孔径，通过调节下部可变光阑的开放程度，可得到此数字以下的各种不同的数值孔径，以适应不同物镜的需要。有的聚光镜由几组透镜组成，最上面的一组透镜可以卸掉或移出光路，使聚光镜的数值孔径变小，以适应低倍物镜观察时的照明。

聚光镜的作用相当于凸透镜，起会聚光线的作用，以增强标本的照明。一般的把聚光镜的聚光焦点设计在它上端透镜平面上方约 1.25mm 处（聚光焦点正在所要观察的标本上，载玻片的厚度为 1.1mm 左右）。

光圈也叫可变光阑，位于聚光镜的下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔。其作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应。可变光阑开得越大，

数值孔径越大（观察完毕后，应将光圈调至最大）。

在可变光阑下面，还有一个圆形的滤光片托架。滤光片安装在光源和聚光器之间。作用是让所选择的某一波段的光线通过，而吸收掉其他的光线，即为了改变光线的光谱成分或削弱光的强度。

3. 光学部分

(1) 物镜：物镜是决定显微镜性能的最重要部件，安装在物镜转换器上，接近被观察的物体，故叫做物镜或接物镜。物镜根据使用条件的不同可分为干燥物镜和浸液物镜；其中浸液物镜又可分为水浸物镜和油浸物镜（常用放大倍数为 90~100 倍）。根据放大倍数的不同可分为低倍物镜（10 倍以下）、中倍物镜（20 倍左右）和高倍物镜（40~65 倍）。

(2) 目镜：因为它靠近观察者的眼睛，因此也叫接目镜。安装在镜筒的上端。通常目镜由上下两组透镜组成，上面的透镜叫做接目透镜，下面的透镜叫做会聚透镜或场镜。上下透镜之间或场镜下面装有一个光阑（它的大小决定了视场的大小），因为标本正好在光阑面上成像，可在这个光阑上粘一小段毛发作为指针，用来指示某个特点的目标。也可在其上面放置目镜测微尺，用来测量所观察标本的大小。目镜的长度越短，放大倍数越大（因目镜的放大倍数与目镜的焦距成反比）。目镜是将已被物镜放大的，分辨清晰的实像进一步放大，达到人眼能容易分辨清楚的程度。常用目镜的放大倍数为 5~16 倍。

(二) 普通光学显微镜的性能和质量

1. 目镜与物镜的关系

物镜已经分辨清楚的细微结构，假如没有经过目镜的再放大，达不到人眼所能分辨的大小，那就看不清楚；但物镜所不能分辨的细微结构，虽然经过高倍目镜的再放大，也还是看不清楚，所以目镜只能起放大作用，不会提高显微镜的分辨率。有时虽然物镜能分辨开两个靠得很近的物点，但由于这两个物点的像的距离小于眼睛的分辨距离，还是无法看清。所以，目镜和物镜既相互联系，又彼此制约。

2. 放大倍数

显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

放大倍数是指眼睛所看到的像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。例：放大倍数为 100 倍（100×），指的是长度是 $1\mu\text{m}$ 的标本，放大后像的长度是 $100\mu\text{m}$ ，要是以面积计算，则放大了 10 000 倍。

3. 数值孔径

数值孔径也叫镜口率，简称为 $N \cdot A$ 或 A ，是物镜和聚光器的主要参数，与显微镜的分辨力成正比。干燥物镜的数值孔径为 0.05~0.95，油浸物镜（香柏油）的数值孔径为 1.25。

4. 工作距离

工作距离是指当所观察的标本最清楚时物镜的前端透镜下面到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关，物镜的焦距越长，放大倍数越低，其工作距离越长。例如：10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17，其中 10 为物镜的放大倍数；0.25 为数值孔径；160 为镜筒长度（单位：mm）；0.17 为盖玻片的标准厚度（单位：mm）。10 倍物

镜有效工作距离为 6.5mm, 40 倍物镜有效工作距离为 0.48mm。

5. 分辨力

分辨力也叫分辨率或分辨本领。分辨力的大小是用分辨距离（所能分辨开的两个物点间的最小距离）的数值来表示的。在明视距离（25cm）之处，正常人眼所能看清相距 0.073mm 的两个物点，这个 0.073mm 的数值，即为正常人眼的分辨距离。显微镜的分辨距离越小，即表示它的分辨力越高，也就是表示它的性能越好。

显微镜的分辨力的大小是由物镜的分辨力来决定的，而物镜的分辨力又是由它的数值孔径和照明光线的波长决定的。

当用普通的中央照明法（使光线均匀地透过标本的明视照明法）时，显微镜的分辨距离为

$$d=0.61\lambda/N \cdot A$$

式中 d ——物镜的分辨距离，单位 nm；

λ ——照明光线波长，单位 nm；

$N \cdot A$ ——物镜的数值孔径。

例如油浸物镜的数值孔径为 1.25，可见光波长范围为 400~700nm，取其平均波长 550nm，则 $d=270\text{nm}$ ，约等于照明光线波长的一半。一般的用可见光照明的显微镜分辨力的极限是 $0.2\mu\text{m}$ 。

6. 焦点深度

当把焦点对准某一物点时，不仅位于该点平面上的各点可看得清楚，而且在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。焦深与总放大率和镜口率成反比，因此高放大率和高镜口率显微镜的焦深就浅，不能看到标本的全厚度，必须调节螺旋改变焦距，并仔细地从上到下进行观察。

7. 视场亮度

视场亮度是指光学显微镜的整个视场的明暗程度。在使用光镜时，不更换物镜和目镜的情况下，视场亮度大，观察到的图像也就大。

（三）显微镜的使用方法

1. 用前的准备工作

（1）打开镜箱，右手握住镜臂，左手托住镜座，小心地把显微镜从镜箱内取出，轻轻地放在实验桌上。

（2）检查显微镜的各部件是否完整和正常，如发现部件损坏或出现故障，应立即停止使用，待排除故障或修复后，才能继续操作。

2. 低倍镜的使用

（1）准备：将显微镜放于前方略偏左侧，必要时使镜筒倾斜（有的显微镜本身已经倾斜）以便观察。转动粗调节器，将镜筒略升高（或将载物台下降）使物镜与载物台距离拉开。以免物镜与载物台相碰。然后旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔（可听到“咔嚓”声）。

（2）对光：打开光圈，上升聚光器，双眼同时睁开，以左眼向目镜内观察，双手并用，左手调焦，右手移片或绘图记录，同时调节反光镜的方向，使视野内的光线均匀，亮度

适中。

(3) 放标本片：标本片的盖片朝上，将标本片放到载物台前方，然后推到物镜下面，用压片夹压住，如有标本移动器，可用上面的弹簧夹夹住标本片，然后把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(4) 调节焦距：从显微镜侧面注视物镜镜头，同时旋转粗调节器，使镜筒缓慢下降（或载物台上升），低倍镜的镜头端与玻片间的距离约 5mm 时，再用左眼从目镜里观察视野，左手慢慢转动粗调节器，使镜筒缓缓上升（或载物台缓缓下降），直至视野中出现物像。如物像不太清晰，可转动细调节器，使物像达到最清晰为止。

如果按上述步骤操作仍看不到物像，可能由以下原因造成：

(1) 转动调节器太快，超过焦点，应按上述步骤重新调节焦距。

(2) 物镜没有对正，应对正后再观察。

(3) 标本没有放到视野内，应移动标本片寻找观察对象。

(4) 光线太强，尤其观察比较透明的标本或没有染色的标本时，易出现这种现象，应将光线调暗一些后再行观察。

3. 高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野的中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜，用手移动转换器，换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微上下转动细调节器，直至视野内看到清晰的物像为止。

如按上述步骤操作仍看不到物像，可能由下列原因造成：

(1) 观察的部分没在视野内，应在低倍镜下找到后，移到视野中央，再换高倍镜观察。

(2) 标本片放反了，应把标本片放正后，再按上述步骤操作。

(3) 焦距没调好，应仔细调节焦距。

有的显微镜高倍镜与低倍镜不配套，从低倍镜转换高倍镜时，往往转不过来或撞坏标本，如遇到这种情况，可把镜筒略升高（或使载物台下降），直接用高倍镜调焦的方法是：从侧面注视物镜，调节粗调节器，使高倍镜头下降至与标本片为最短距离，再观察目镜视野，慢慢调节细调节器，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。如需要更换标本片时，应该先把镜筒升高（或使载物台下降），然后把标本片移到载物台前方，再取下。

4. 油镜的使用方法

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像，把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开，在标本片上滴一滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，可来回调动细调节器，即可看清物像。如仍看不清，应按上述步骤重复操作。

(3) 找到物像后，再调节聚光器和光圈，选择最合适光线。

(4) 油镜使用完毕后，把镜头上升约 10mm，并转到一边，用擦镜纸把镜头擦干净。如仍擦不干净，可用擦镜纸蘸少许镜头清洗剂或二甲苯轻擦，然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖片的标本片, 可用擦镜纸蘸少许镜头清洗剂或二甲苯, 把油擦净。无盖片的标本片, 可用拉纸法擦油。方法是: 先把一小张擦镜纸盖在油滴上, 再滴上二甲苯, 平拉擦镜纸, 反复几次即可擦净。也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

5. 使用练习

(1) 低倍镜使用练习: 取一张 A 字片, 用低倍镜观察。练习对光、调焦, 并注意观察物像与玻片移动方向是否一致, 镜下观察的字母是正像还是反像?

(2) 高倍镜使用练习: 取一张毛发交叉片, 先用低倍镜观察, 找到羊毛交叉点, 移到视野中央, 换高倍镜观察。调节焦距, 注意观察上下羊毛的清晰度。

(3) 油镜使用练习: 取一张血涂片, 先用低倍镜、高倍镜观察, 再练习用油镜观察。注意比较三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同。练习分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和标本片。

(四) 使用显微镜的注意事项

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂, 左手托镜座, 切勿一手斜提, 前后摆动, 以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时, 显微镜离实验台边缘应保持一定距离 (约 10cm), 以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过 45° , 用完立即还原。

(3) 使用时要严格按步骤操作, 熟悉显微镜各部件性能, 掌握粗、细调节器的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节器向下时, 眼睛必须注视物镜头。

(4) 观察带有液体的临时标本时要加盖片, 以免液体污染镜头和显微镜。

(5) 粗、细调节器要配合使用, 细调节器不能单方向过度旋转, 调节焦距时, 要从侧面注视镜筒下降, 以免压坏标本和镜头。

(6) 用单筒显微镜观察标本, 应双眼同时睁开, 左眼观察物像, 右眼用以绘图, 左手调节焦距, 右手移动标本或绘图。

(7) 禁止随意拧开或调换目镜、物镜和聚光器等零件。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙东西擦拭, 以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂和药品, 如碘、乙醇溶液、酸类、碱类等都不可与显微镜接触, 如不慎污染时, 应立即擦干净。

(10) 实验完毕, 要将玻片取出, 用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开, 不能与通光孔相对。用绸布包好, 放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下暴晒。

五、作业与思考题

1. 作业题:

(1) 填图 (图 1-3)。

(2) 简述显微镜的使用方面。

2. 思考题:

(1) 为什么使用高倍镜和油镜时, 必须从低倍镜开始?

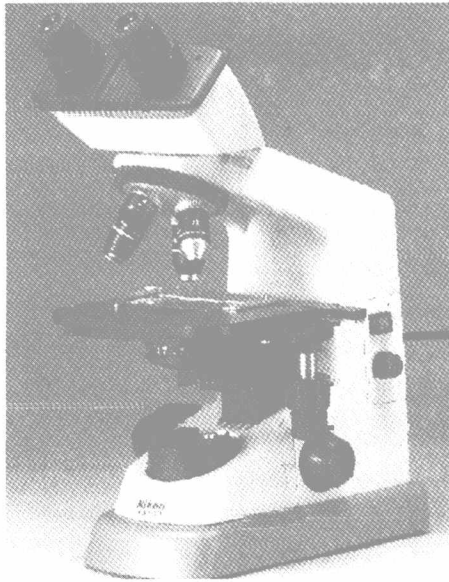


图 1-3 YS-100 双目显微镜

(2) 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？为什么？

(3) 如果在高倍镜下未找到你所需要观察的物像，你应该从哪些方面找原因，以求解决。

实验二 特殊显微镜的原理和使用

一、实验目的

- (1) 通过演示和参观等形式掌握各种特殊显微镜的原理、构造及其使用方法。
- (2) 熟练掌握荧光显微镜的使用。

二、实验原理

(一) 暗视野显微镜

暗视野显微镜 (dark ground microscope) 和普通显微镜相似, 只不过是利用暗视野照明法进行镜检, 它不能直接观察到照明光线, 只能观察到被检物体所反射或衍射的光线。因此, 视野呈黑暗的背景, 而被检物体则呈现明亮的像。

暗视野照明法通用的有两种方式。

1. 中心遮光法

用中央纸板遮去中央光束, 然后将这样的纸板放在聚光器下面的滤光片支架上, 修整遮光面积和纸板大小, 使聚集在聚光器焦点的直接照明光线的中央光束被遮掉, 视野基本黑暗, 而保证侧面斜射过来的光照射亮被检物。

2. 暗视野聚光器法

常用抛物面聚光器, 中央有黑挡板以遮光, 并使落在抛物面上的光线无法反射出来, 当暗视野聚光器的数值孔径大于物镜的数值孔径时, 照明光线不能进入物镜, 只有标本的散射光线进入物镜。

暗视野显微镜能观察到 $0.2\sim 0.004\mu\text{m}$ 的亚微颗粒, 看到细胞在明视野照明下无法分辨的结构, 但无法分辨物体的内部结构, 因而它主要用来观察活细胞中微粒的运动, 观察单细胞、硅藻、放线菌、细菌的线状结构如纤维和鞭毛等。

(二) 相差显微镜

相差显微镜 (phase contrast microscope) 是能将物体本身的相位差 (或光程差) 转换为振幅 (光强度) 变化的显微镜。人的眼睛只能鉴别可见光的波长和振幅的变化, 但活的生物多为无色透明, 当光线通过时, 波长和振幅很少发生变化, 而生物材料各部分之间以及与环境之间往往有折射率的差别, 光线透过后可产生相位的改变。

相差显微镜主要用于观察活体细胞、不染色的组织切片或减少反差的染色标本，但切片都不宜过厚，一般以不超过 $20\mu\text{m}$ 为宜，载玻片须均匀一致，厚度在 1mm 左右，盖玻片也以 $0.17\sim 0.18\text{mm}$ 的厚度为宜。

(三) 荧光显微镜

荧光显微镜 (fluorescence microscope) 是利用较短波长的紫外光照射标本，使样品受到激发，产生较长波长的荧光，可用来观察和分析样品中产生荧光的成分和结构、位置，观察的主要荧光有自发荧光、染色荧光、诱发荧光、免疫荧光和酶诱发荧光等。原发荧光，或称一次荧光，是标本不经任何处理，在紫外线照射下发出的荧光；染色荧光，或称二次荧光，是标本经荧光染料处理后那些对荧光染料具有选择性吸收的部分经激发后发出的荧光。

荧光显微镜与普通光学显微镜不同，它的光源不是起直接照明的作用，而是作为一种激发标本内的荧光物质的能源，荧光经物镜和目镜的放大后，在黑暗的背景下呈现彩色的荧光图像。

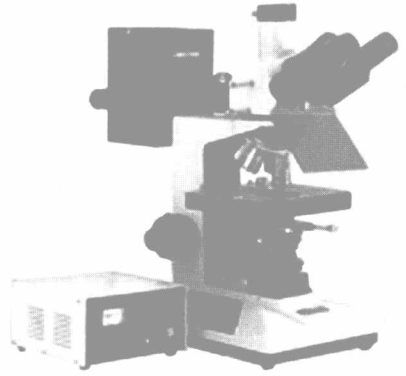


图 2-1 XSP-10C 型荧光显微镜

(四) 偏光显微镜

偏光显微镜 (polarization microscope) 是一种具有起偏振器、检偏振器和补偿器等装置的特殊显微镜，借助偏光显微镜可以观察生物标本是否为双折射物体，并可判断双折射率的正负，推断物体内分子的排列。在生物学研究中，偏光显微镜主要用于观察有双折射性的结构，如纺锤体、骨骼、鳞片、牙齿等，还可鉴别脂肪、淀粉粒和某些蛋白质。

(五) 干涉显微镜

干涉显微镜 (interference microscope) 是通过标本内和标本外的相干光束产生干涉，把经物体的相位差转换成振幅变化的显微镜，使用干涉显微镜可以测量光程差，并在知道标本面积后，即可算出标本的干重。利用此法，可以追踪测量活细胞在不同生活状态下的干重，但细胞各点的相位差是不均一的，可以利用扫描显微干涉仪，通过扫描方式逐点测量光程差，积分后给出这种不均质相位物质的总干重。

(六) 体视显微镜

体视显微镜 (stereo microscope) 外表像双目显微镜，用以观察小生物体局部或小的器官组织及细胞群等，还可用于对小的组织器官和小生物体的解剖 (图 2-2)。

普通显微镜的造像是倒立的，但体视显微镜所观察到的是正立像，像具有立体感，但放大倍数一般不高，

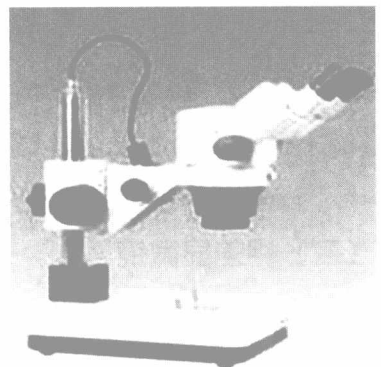


图 2-2 JSZ7 型体视显微镜

最高为 200 倍。

(七) 倒置显微镜

倒置显微镜 (inverted microscope) 是一种为适应生物学中大量发展的组织细胞离体培养工作的显微观察的需要而发展起来的一种光学显微装置。它的特点是能直接对培养皿、培养瓶中的标本进行显微观察, 它的物镜、物体和光源的位置刚好与经典的显微镜颠倒, 因而称为“倒置”。

(八) 共聚焦显微镜

共聚焦显微镜 (confocal microscope) 是近年来新发展出来的一种显微镜, 它利用的是共焦成像的原理, 用一组透镜充当聚光器和物镜, 光束自上而下经第一口径和透镜后聚焦在“物镜”后焦平面的标本上, 从标本发出的光 (可以是反射光也可以是荧光) 再返经透镜聚焦在第二口径处, 第二口径的大小直接决定所收集的发散光的多少。通过增大物镜的数值孔径, 减小共焦孔径的大小, 可以增强共聚焦的效果, 使得观察视野中仅聚焦部位的物体像清晰, 其余部位呈现黑色, 给研究工作的确认和分辨带来了极大的便利。



图 2-3 TS00 倒置生物显微镜

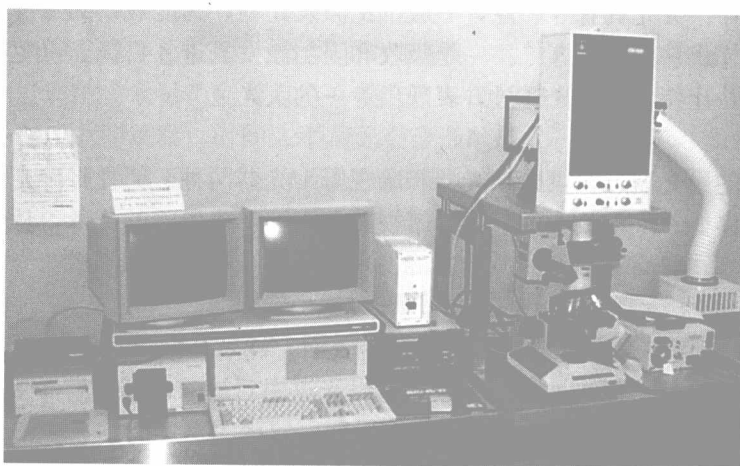


图 2-4 BIO-Rad MRC-600 系列激光扫描共焦成像系统

三、实验仪器、材料和试剂

各种特殊显微镜 (包括荧光显微镜)、人口腔黏膜上皮细胞临时装片、95% 乙醇、0.01% 吖啶橙染液、洁净载玻片、盖玻片、眼科镊、吸水纸等。