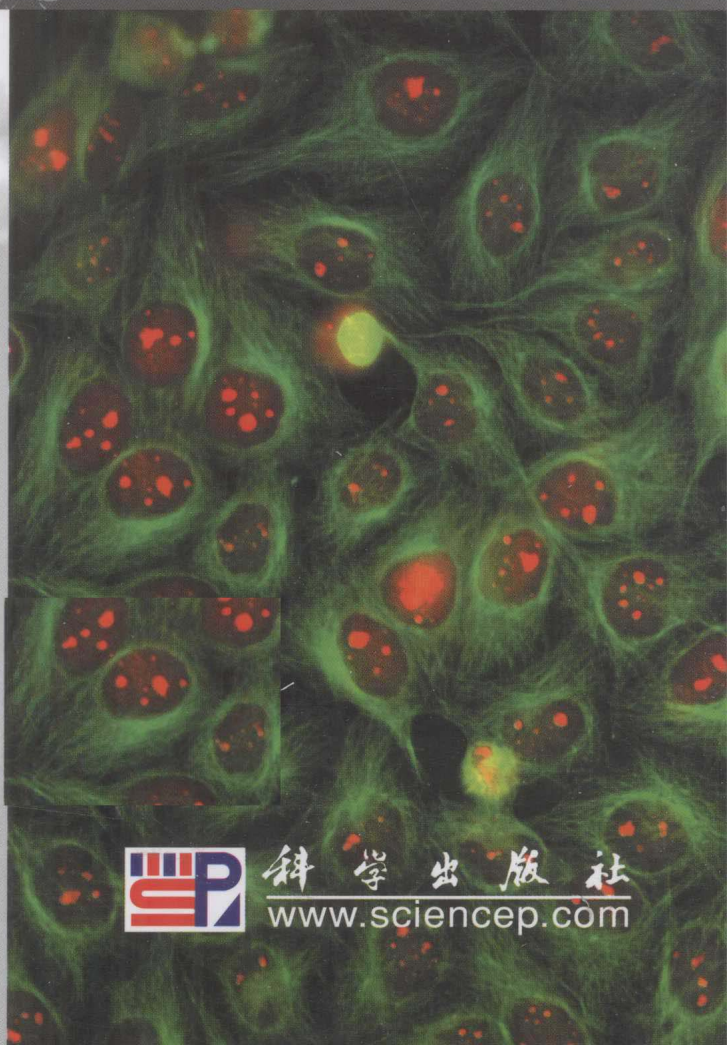
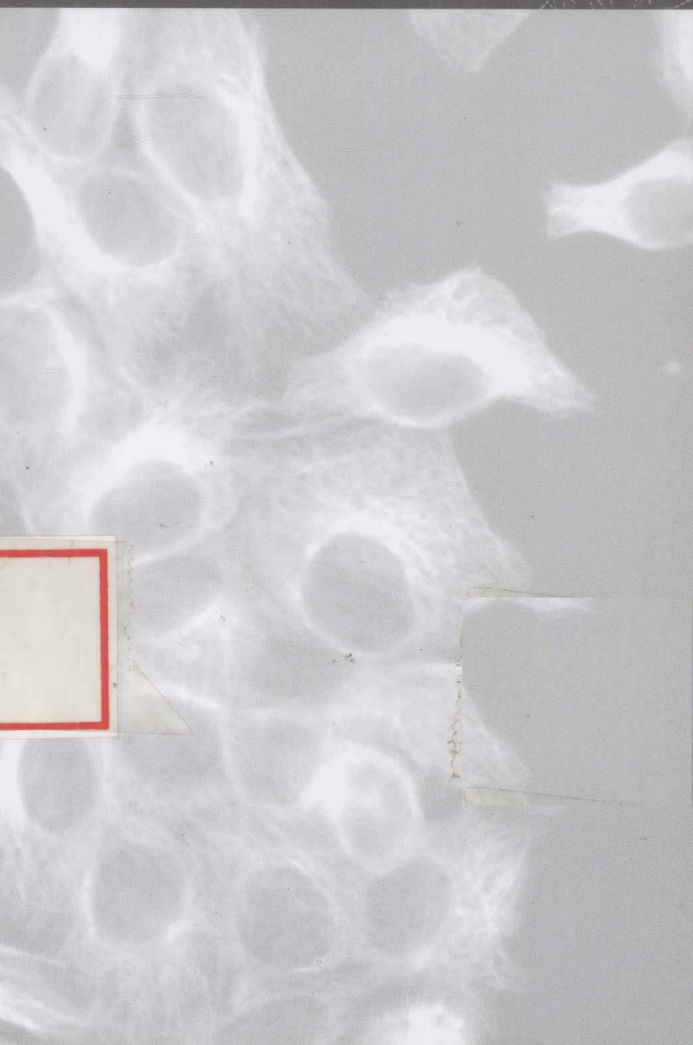


细胞生物学 实验指导

桑建利 谭 信/主编

CELL LABORATORY MANUAL



科学出版社
www.sciencep.com

细胞生物学实验指导

桑建利 谭 信 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书为细胞生物学配套实验教材,全书包括实验方法介绍和附录。所介绍的实验方法既有经典的较为简单的实验,也有新的较为复杂的实验,基本涵盖了目前各高等学校细胞生物学实验教学中所涉及的实验,包括显微镜基本原理与使用、亚细胞结构观察、染色体制备与分析、细胞内生物大分子的分析、细胞培养与生长特性分析、细胞融合与显微操作技术,共6章39个实验。附录提供了实验中常用到的相关参数与资料,包括常用细胞生物学实验仪器简要操作程序与维护、常用细胞生物学实验试剂与溶液、显微镜镜头、滤光片、发射/激发谱和常用符号说明、常用细胞系或细胞株等。

本书可供综合性大学、农林、医学、师范院校相关专业本科生和研究生的细胞生物学实验教学使用,也可作为相关研究人员实验工作的参考书。读者在使用过程中,可根据条件和需要对本书内容进行选择。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验指导/桑建利,谭信主编. —北京:科学出版社,2010.2
ISBN 978-7-03-026566-1

I. 细… II. 桑…谭… III. 细胞生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 016249 号

责任编辑:王国栋 李晶晶 / 责任校对:钟 洋
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

北京天时彩色印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年2月第一次印刷 印张:13 1/2

印数:1—4 000 字数:320 000

定价:27.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

细胞是生物体生命活动结构和功能的基本单位。细胞生物学作为生命科学的支柱学科之一,本身是一门实践性很强的学科。细胞生物学实验技术的发展为细胞生物学的持续深入提供了重要保证。在当今越来越强调学生实践和动手能力的趋势下,丰富实验教学,引入新的细胞生物学实验技术,对于学生综合实践能力的培养和提高以及把握当今细胞生物学发展脉络是非常必要的。细胞生物学作为高等院校生物学教学体系中的主干课程之一,在加强理论课教学的同时,实验教学的重要性日益突出。

细胞生物学发展迅速,新的实验技术不断涌现,为了提高教学水平,需对原有细胞生物学实验进行增补和修改。为此,我们结合北京师范大学细胞生物学实验课多年教学经验的积累和内容的总结,同时参考其他相关教材,确定了本书编写的基本框架与实验内容。

本书的编写试图在实验技术上具备基础性、科学性和先进性,并在实验教学理念、方法和目的上进行一些新的尝试。书中不仅对实验过程尽可能具体地描述,还介绍实验原理与技术背景,同时提出教学建议,力图从教和学的各个环节全面统筹安排内容。

目前与细胞生物学相关的实验内容繁多,编写过程中作者进行了认真的调研、比较分析和选择,力求做到:①内容丰富,基本涵盖全国大部分高校生命科学相关专业所开设的细胞生物学实验内容;②经典实验与现代实验技术相结合,既包括经典的、常规的实验,如DNA的细胞化学-Feulgen反应、小鼠骨髓染色体的制备等,又有部分现代的细胞生物学实验,如细胞mRNA原位杂交技术、流式细胞光度术检测细胞周期、卵母细胞的超排及显微注射技术等;③实验方法可靠,所选择的实验技术已在教学和科研工作中熟练使用;④保证实验顺利进行,书后设有附录部分,介绍常用细胞生物学实验仪器简要操作程序与维护、常用细胞生物学实验试剂与溶液的配制、常用细胞系或细胞株等,这将为整个实验工作提供很大的帮助。

本书由多年来从事细胞生物学教学和科研的教师执笔,所编写的内容包含了他们的实验技巧、经验和研究成果。参与编写的人员有(以姓氏笔画为序):张伟(实验19、实验31)、郑东(实验6、实验7)、桑建利(实验8~11、实验20~23、实验33~34)、彭安(实验4、实验18、实验24~29、实验32、实验35及部分附录)、谭信(实验1~3、实验5、实验12~17、实验30、实验36~39及部分附录)。北京师范大学生命科学学院细胞生物研究所部分研究生参与了实验的验证工作,在此表示感谢。实验中的结

果采用黑白照片，必需采用彩色照片才能清楚表示的部分结果将作为插页放在书后，同时仍在文中保留黑白照片。为节省篇幅，在多个实验中会使用到的试剂其配制方法将统一放到附录中，供参考使用。

本书的编写得到教育部高等理工教育教学改革项目与北京市教委高等教育精品教材建设项目的资助，在此表示感谢。

由于编写时间仓促，书中难免存在不足之处，恳请广大读者批评指正。

桑建利
北京师范大学生命科学学院
2009年6月

目 录

前 言

第一章	显微镜基本原理与使用	1
实验 1	普通光学显微镜的基本构造和使用方法	2
实验 2	荧光显微镜及其他特殊用途显微镜的基本构造和使用方法	10
实验 3	共聚焦显微镜基本构造和使用方法	20
实验 4	显微数码技术	25
实验 5	石蜡切片的制作及 HE 染色	29
实验 6	透射电子显微镜工作原理和使用(超薄切片技术)	34
实验 7	扫描电子显微镜工作原理和使用(临界点干燥技术)	41
第二章	亚细胞结构观察	46
实验 8	细胞核与线粒体的提取与观察	47
实验 9	细胞骨架的观察	49
实验 10	叶绿体的分离与观察	53
实验 11	细胞中心体的观察	55
实验 12	着丝粒蛋白的间接免疫荧光染色与观察	56
第三章	染色体制备与分析	61
实验 13	小鼠骨髓细胞染色体的制备	62
实验 14	培养细胞染色体的制备	64
实验 15	人外周血淋巴细胞细胞分离、培养及染色体标本制作	68
实验 16	染色体 G 带染色	73
实验 17	细胞核仁组织区的观察	80
实验 18	两栖类灯刷染色体的制备	85
实验 19	染色体 FISH 技术	88
第四章	细胞内生物大分子的分析	92
实验 20	DNA 的定量测定——Feulgen 反应	92
实验 21	细胞中酸性磷酸酶的定位	94
实验 22	细胞中 mRNA 原位杂交技术	97
实验 23	单细胞电泳技术	102

第五章	细胞培养与生长特性分析	107
实验 24	动物组织培养准备技术	109
实验 25	动物细胞传代培养	118
实验 26	细胞冻存与复苏	121
实验 27	动物细胞原代培养	125
实验 28	细胞生长曲线的测定 (MTT 法)	128
实验 29	新牛血清的筛选及药物筛选	131
实验 30	流式细胞光度术检测细胞周期 (PI 荧光标记法荧光测量)	134
实验 31	细胞凋亡的诱导与观察	137
实验 32	S 期细胞同步化方法	140
实验 33	动物细胞转染技术	143
实验 34	植物原生质体的分离与培养	146
实验 35	细胞放射自显影	149
第六章	细胞融合与显微操作技术	154
实验 36	小鼠巨噬细胞吞噬	154
实验 37	HeLa 细胞与鸡红细胞的融合实验	157
实验 38	早熟染色体凝集	160
实验 39	卵母细胞的超排及卵母细胞培养	163
参考文献		167
附录		168
附录 1	常用细胞生物学实验仪器简要操作程序与维护	168
附录 2	常用细胞培养用液的基本成分与常见染液的配制	188
附录 3	显微镜技术: 常用镜头的一些符号说明	197
附录 4	常用荧光染料介绍	198
附录 5	常用细胞系或细胞株	199
附录 6	细胞污染的预防	205
附录 7	一些常用化合物的溶解度 (20℃)	210
图版 I		
图版 II		

第一章 显微镜基本原理与使用

生物体的微观结构具有高度的复杂性和层次性。通过对微观结构的观察，可以深入了解组织和细胞的结构及其与功能的关系。生物显微镜是研究组织和细胞微观结构与功能的基本工具。与此相关的生物显微镜技术主要可以分为光学显微镜技术和电子显微镜技术，二者在细胞生物学的建立与发展中起着不可或缺的重要作用。

利用玻璃凸透镜可将物体成像并且放大的现象来制造光学显微镜的尝试始于 16 世纪末。大约在 1590 年，荷兰眼镜商詹森（Z. Janssen）父子第一次将不同镜片组合在一个圆筒中用于放大物体，这成为复式显微镜和望远镜的前身。在 1665 年出版的《显微图集》中，英国科学家胡克（R. Hooke）第一次使用“细胞”一词描述了所观察的对象。此后，列文虎克（A. Leeuwenhoek）用显微镜观察到了真正的活细胞和微生物。19 世纪之后，随着光学显微镜制造水平的提高以及生物样品染色技术等的发展，细胞核、线粒体、染色体和高尔基体等细胞内的结构相继被发现。目前常用的生物光学显微镜包括相差显微镜、荧光显微镜和激光共聚焦显微镜等，相关技术适用于活细胞结构、动态过程及多维成像。通过与细胞化学、细胞免疫学及分子生物学等技术方法相结合，生物光学显微镜技术已不囿于组织与细胞形态观察的范围，广泛应用于细胞生理、发育、免疫和遗传等多学科的综合研究。

电子显微镜技术是观察组织和细胞亚微结构与功能的基本方法。1931 年，德国科学家鲁斯卡（E. Ruska）等研制出了世界上第一台透射电镜，标志着人类开始利用电子光学仪器探索物质的微观结构。鲁斯卡因此荣获 1986 年诺贝尔物理学奖。传统透射电镜生物样品制备技术包括超薄切片技术、电镜细胞化学技术、免疫电镜技术、电镜放射自显影技术等。利用这些技术可以观察细胞亚微结构，对酶、蛋白质、核酸以及脂肪等进行细胞内定位，对抗原进行定位和定量分析，并且研究物质在细胞内的合成、转运等动态过程。超薄切片技术的应用对于了解细胞亚微结构与功能做出了显著贡献。利用近年来发展成熟的冷冻电镜术（cryo-electron microscopy, cryo-EM）可以测定分离纯化的蛋白质分子、病毒颗粒及细胞器等的三维结构。在研究细胞与组织三维结构方面，电子断层摄影术（electron tomography, ET）具有诱人的应用前景。与激光共聚焦显微术相比，利用电子断层摄影术可以对细胞与组织进行较高分辨率的三维成像。与透射电镜不同，扫描电镜用于观察细胞等生物样品的表面形貌。光学显微镜技术和电子显微镜技术各有所长，二者之间相辅相成。光学显微镜生物样品制备简便，易于标记，适合于研究活细胞结构及其动态过程。电子显微镜分辨率高，适用于研究细胞与生物大分子的精细结构及定位。然而传统电子显微镜生物样品制备繁复，周期长，一般不适合活细胞的动态观察。

本章的目的在于使学生了解光学显微镜和电子显微镜的基本结构、工作原理与使用方法；了解并掌握两类显微镜生物样品制备的基本过程及方法；了解生物显微镜技术的

一些应用。由于篇幅所限,本章未能对生物光学显微镜和电子显微镜及其技术作详细叙述。有兴趣的读者可以进一步阅读有关参考文献。

实验1 普通光学显微镜的基本构造和使用方法

【实验目的】

了解普通光学显微镜的构造、基本原理、维护和保养的方法。掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。

【实验原理及技术背景】

光学显微镜(light microscope)由光学系统照明部分和机械装置组成。光学系统包括光源、聚光镜和放大系统等部分。其中光源用于照明生物样品。聚光镜用于汇聚光源的光线于样品上。在光源的照射下,生物样品的各个位点依其光吸收特性的不同而形成图像。放大系统一般由物镜和目镜组成。物镜使标本在物镜的上方形成一个倒立的放大实像,目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上,形成一个正立的实像。光学显微镜的机械装置包括载物台、调节旋钮和支架等部件,用于调节光学系统和安置样品。现在的光学显微镜已可把物体放大1500倍左右。

【实验用品】

器具:普通光学显微镜。

试剂:液体石蜡、香柏油或Immersionoil、镜头清洗液(乙醚:无水乙醇=7:3或二甲苯)。

材料:各种动植物组织细胞或微生物玻片标本。

【实验方法与步骤】

(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1-1)。

1. 机械部分

1) 镜座、镜柱、镜臂和镜筒

镜座是显微镜的基座,起稳定和支持整个镜身的作用。在镜座上装有照明光源或聚光镜。镜柱是镜筒直立式光镜连接镜座和镜臂的短柱。镜筒倾斜式显微镜没有此装置,而是将镜臂和镜柱连在一起。镜臂支撑和固定镜筒、载物台和调焦装置,也是移动显微镜时的把手。镜筒是镜臂前上方的圆筒状结构,上端套接目镜,下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目,光学显微镜可分为单筒式和双筒式两类,单筒式又分直立式和倾斜式两种,而双筒都是倾斜式的。双筒镜筒有调距装置,用于调节两镜筒之间的距离,以适合不同人的眼距。其中的一个镜筒上还装有视度调节。

2) 物镜转换器(revolving nosepiece)

是镜筒下方的圆盘状结构,其上有3~5个圆孔,可安装不同放大倍数的物镜,使用时根据需要转动转换器来更换观察用的物镜。转换器的内缘有一“T”形卡,用于对

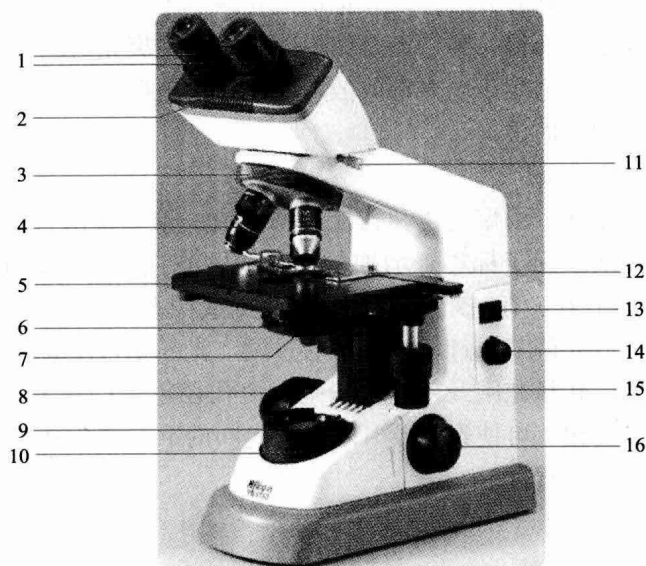


图 1-1 光学显微镜的基本构造

1. 目镜；2. 视度调节；3. 物镜转换器；4. 物镜；5. 载物台；6. 聚光镜孔径光栅调节杆；
7. 聚光镜；8. 粗调焦手轮；9. 滤色镜座；10. 集光器；11. 镜筒固定螺丝；12. 标本移动器；
13. 电源开关；14. 亮度调节钮；15. 载物台移动手轮；16. 微调焦手轮

准和固定物镜位置。

3) 载物台 (stage)

又称工作台，位于镜筒的下方，固定在镜臂上，方形或圆形，用于放置玻片标本。中央有一孔以便通光。有些显微镜的台面上装有标本移动器。移动器上的弹簧夹用于固定标本。标本移动器可使标本移动，在载物台两边或一边（在推进器上面或在载物台下面）装有两个移动手轮，转动手轮分别使载物台带动载玻片前后方向或左右方向移动以便寻找观察目标或观察标本的不同视野。有些显微镜在载物台的纵向和横向上装有游标尺以测定载物台移动的距离，可据此测定标本的大小；或对被检视野进行标记，以便下次观察时再检查该视野。有的显微镜不设标本移动器，而在两旁各有一压片夹，用于固定载玻片。

4) 调节器 (regulator)

安装在镜臂两侧的一对大小旋钮用于调节焦距。大旋钮为粗调焦手轮，转动粗调焦手轮可使镜筒（或载物台）升降，一般用于低倍镜的调焦。小旋钮为细焦手轮，转动细调焦手轮可使镜筒或载物台小幅度升降。适用于高倍镜和油镜的调焦。

2. 照明部分

1) 光源或反光镜 (reflecting mirror)

安装在聚光器下方的镜座上。有些显微镜用安装在镜座内的灯泡为光源，经聚光镜汇集向上。点按光源按钮即可产生人工光源。再通过亮度滑钮或旋钮调节光源亮度。有

些显微镜安置反光镜采集外界光线。反光镜可以在两个轴方向任意旋转以汇集光线于聚光镜。反光镜的一面是平面镜，另一面是凹面镜，平面镜聚光力弱，适于强光源和平行光源。凹面镜聚光力强，适用于弱光源或散射光源。可根据光源的性质选择使用，光强时用平面镜，光弱时用凹面镜。

2) 聚光器 (condensor)

在载物台和光源之间，由聚光镜和孔径光阑组成。聚光镜由一片或数片透镜组成，起聚光的作用，使光线聚集于标本，增加射入物镜的光强。孔径光阑也叫光圈 (aperture)，位于聚光镜的下方，有一组活动金属薄片围成圆孔。推动孔径光阑的小柄可以调节孔径的大小，并以此调节通过的光线。通过调节光强度，使聚光镜的数值孔径和物镜的数值孔径相一致。孔径光阑开得越大，则数值孔径越大；反之，则数值孔径越小。一般在镜柱一侧有一旋钮，可使聚光器升降。在光圈的下方常装有滤光片架，安置滤光片可对透过的光的波长进行选择。

3. 光学部分

1) 物镜 (objective)

也称接物镜，是装在物镜转换器上的一组镜头，物镜的作用是把标本作第一次放大。根据光线透过的介质不同，可将物镜分为干燥物镜和油浸物镜。在使用干燥物镜时，载玻片与物镜之间的介质是空气。干燥物镜按放大倍数还可以分为低倍物镜、中倍物镜和高倍物镜。一般把 10 倍以下的物镜叫低倍物镜，把 20 倍的物镜叫中倍物镜，40 倍以上的物镜叫高倍物镜。油浸物镜以香柏油或液体石蜡作为标本和镜头之间的光传播介质。使用时需在标本上点上一滴镜油，并将物镜浸入镜油中。国产显微镜的油浸物镜常标有“油”字，国外产品则常用“oil” (oil immersion) 或“HI” (homogeneous immersion) 字样，以供识别。油镜放大倍数一般为 100 倍。物镜上一般刻有放大倍数、数值孔径 (亦称镜口率)、工作距离等主要参数。放大倍数用 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 等显示。NA 表示数值孔径，它反映镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨力越高。各种物镜常用符号见附录。

2) 目镜 (eyepiece)

又称接目镜，短圆筒状，装在镜筒上端，可拆卸。目镜由上下两组透镜组成，上面的叫接目透镜，下面的叫会聚透镜。上下透镜之间装有一个光阑，它的大小决定了视野的大小。目镜上还可以放置测微目尺，上有等分刻度，用以测量经显微镜放大后的物像大小。在目镜上刻有放大倍数，一台显微镜常备有 $10\times$ 、 $15\times$ 等放大倍数不同的目镜。可根据不同的需要选择使用。通过目镜可将物镜放大的实像进一步扩大使之能被观察到。

(二) 普通显微镜的光学原理和性能

1. 光学显微镜的成像原理

由外界入射的光线经反光镜反射或汇集向上，或由内光源发射的光线经聚光镜向

上, 在聚光镜的作用下会聚在被检标本上, 使标本得到充分的照明, 经标本反射或折射出的光线经物镜进入镜筒, 在目镜的焦平面上成放大的实像, 该实像再经目镜的接目透镜放大成虚像, 所以人们看到的是虚像 (图 1-2)。

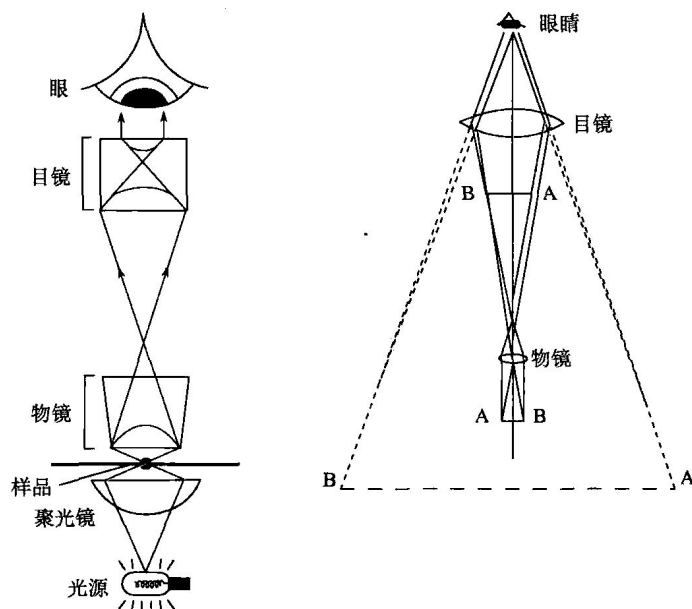


图 1-2 光学显微镜的成像过程

2. 光学显微镜的性能指标

光学显微镜的性能和质量的指标包括分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等。这些指标彼此相互制约, 若改善或提高某方面的性能, 都会使另一性能降低。

1) 分辨力

分辨力 (resolving power) 也称分辨率或分辨本领, 是指显微镜能够辨别发光的两个点或两条细线间最小距离的能力。该最小的距离称为鉴别限度 (R)。评价一台显微镜的质量优劣, 不仅要看其放大倍数, 更重要的是看其分辨率。鉴别限度与光的波长、标本与物镜间介质的折射率和开口角度有关。物镜前面发光点发射的光线进入物镜的角度称开口角度。开口角度与透镜的放大率成正比。数值口径 (numerical aperture, NA) 又称开口率, 是光线投射到物镜上的最大开口角度一半的正弦与标本和物镜间介质的折射率的乘积。即

$$NA = n \cdot \sin\theta$$

式中, NA 为数值口径; n 是介质折射率; θ 为最大开口角度的半数。

由于 θ 最大只能到 90° (实际上不可能达到), 则 $\sin 90^\circ = 1$ 。介质为空气时 $n = 1$, 所以使用干燥物镜的数值口径都小于 1。使用油镜时, 物镜与标本间的介质为香柏油 ($n = 1.515$) 或液体石蜡 ($n = 1.52$), 因此可以增大数值口径, 目前技术下最大的数值口径可达 1.4 (图 1-3)。

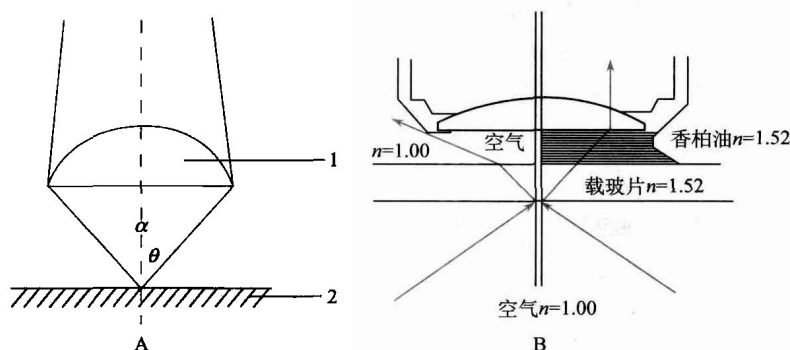


图 1-3 A. 物镜的光线入射角; B. 干燥物镜和油镜光线通路

1. 物镜; 2. 样品

鉴别限度与数值口径的关系为

$$R = 0.61\lambda / NA$$

式中, R 为鉴别限度; λ 为光的波长; NA 为数值口径。

如果以日光的波长 $\lambda = 0.5\mu\text{m}$ 计算, 使用 $NA = 1.4$ 的物镜, 则 $R = 0.61 \times 0.5 / 1.4 \approx 0.22 (\mu\text{m})$ 。据测定, 人眼的分辨力约为 $100\mu\text{m}$, 光学显微镜可将分辨力提高数百倍。

2) 放大率

放大率是与分辨力不同的另一显微镜参数。被检物体经显微镜的物镜和目镜放大后的总放大倍数是物镜的放大倍数和目镜放大倍数的乘积。即

$$\text{实物放大倍数} = \text{物镜放大倍数} \times \text{目镜放大倍数}$$

如使用放大 40 倍的物镜和放大 10 倍的目镜, 则显微镜的总放大倍数是 400 倍。但要注意, 分辨力并不能随放大倍数的提高而无限提高, 因此光学显微镜有自己的有效放大倍数。

据计算, 显微镜的有效放大倍数是

$$E \cdot O = 1000 \times NA$$

式中, E 为目镜放大倍数; O 为物镜放大倍数, 则目镜的有效放大倍数是: $E = 1000NA/O$ 。因此可知, 目镜的有效放大倍数取决于与之组合的物镜放大倍数, 使用过大放大倍数的目镜并不能提高显微镜的分辨率。

3) 焦点深度

使用旋钮调节焦点于样品的某处时, 该处平面上可获得最为清晰的图像。此平面上下一定厚度范围也可获得相对清楚的影像。这个清晰部分的厚度称为焦点深度。焦点深度与总放大率和数值口径成反比, 因此在高放大率和高数值口径情况下焦点深度变浅, 如想看到标本不同层面的内容, 需调节细调节器螺旋改变焦距, 就可连续观察到标本不同层面结构的变化。

4) 工作距离

工作距离是指观察标本最清晰时, 物镜的下表面与标本之间的距离。物镜的放大倍

数越大,则工作距离越短。油镜的工作距离最短,只有不到 0.3mm,此时要求盖玻片的厚度不能超过工作距离,而且在使用油镜时应注意防止油镜头与载玻片或盖玻片相撞而造成玻璃破裂。虽然不同放大倍数的物镜工作距离不同,但生产厂家已对同一系列的不同物镜相对长度进行匹配,使安装在同一物镜转换器上的不同放大倍数物镜转换时,标本都能处在观察焦点附近,只需稍微调节细调节器便可使物像清晰。

(三) 显微镜的使用方法

1. 准备工作

1) 显微镜的放置

取出显微镜时应右手持住镜臂,左一手托住镜座,将显微镜轻放在左前方的实验台上,注意轻拿轻放。检查显微镜的各部件是否完整和正常。先确认显微镜的电源开关处于关闭状态,亮度调整电位器处于最小,再将电源插头插入插座,然后打开光源开关,调节光强到合适大小。不带自备光源的显微镜以散射日光或室内灯光作为光源,不能采用直射阳光。晴天可用近窗的散射光作光源。

2) 调整光源和光阑

在接通电源或利用反光镜取得光源后,取下目镜,直接观察镜筒内向上射的光线,调节聚光镜上的孔径光阑,使其孔径略小于视野,此时物镜的数值孔径和聚光镜的数值孔径一致,既可充分发挥该物镜的分辨力,又能把该物镜接受范围之外的多余光挡住,否则这些光线产生的干扰会影响清晰度。若将孔径光阑开放过大,超过物镜的数值孔径时,便产生光斑;若收缩孔径光阑过小,分辨力下降,反差增大。原则上使用不同的物镜时应相应调节孔径光阑使之匹配,但一般只在需细致观察标本才这样做。放回目镜后,通过调节聚光器上的视场光阑或调节亮度滑钮或旋钮,选择最佳的照明效果。

2. 低倍镜的使用

低倍镜可将标本放大 100~200 倍,一般用于为高倍镜或油镜观察确定视野。无论最终以多少放大倍数观察标本,都必须从低倍镜开始。

1) 放标本片

转动粗调节钮,将镜筒略升高(或将载物台下降),使物镜与载物台距离拉开,留出放置标本的空间。取一玻片标本放在载物台上,注意使载有标本(常有盖玻片)的一面朝上,切不可放反,用标本移动器弹簧夹夹住,然后转动标本移动器旋钮,将所要观察的部位调到通光孔的正中。或用压片夹夹住,使待观察的部分居于正中。由于生物样品在观察前常要进行染色,因此可先用肉眼注意观察玻片上正常着色的部分,将其放入光路。旋转物镜转换器(切忌手持物镜移动),将低倍镜对准载物台中央的通光孔。转到正确位置时可有转换器被卡进位的感觉或听到碰叩声。

2) 调节焦距

从显微镜侧面注视物镜镜头,同时旋转粗调节钮,使镜筒缓慢接近载物台,至低倍

镜的镜头端与玻片间的距离明显低于最终使标本清晰的距离时为止。该距离的确定需要经验,一般约 5mm 即可。再从目镜里观察视野,同时慢慢转动粗调节钮,使镜筒缓缓上升,直至视野中出现物像。如物像不太清晰,可转动细调节钮,使物像达到最清晰为止。如果观察对象不在视野中心,可调节标本移动器将其调到中心。注意移动玻片的方向与视野物像移动的方向是相反的。注意视焦平面的正确判断,镜筒缓慢远离载物台时,最先出现的清晰视焦平面往往是载玻片的底部,即与标本相对的一面,然后才是要观察的标本视焦平面。如果继续转动调节旋钮,将看到盖玻片的上表面。

如果按上述步骤操作,物镜头与载物台之间已超过工作距离仍观察不到物像,说明操作失败,从以下情况分析原因:①转动调节旋钮太快,未注意到视焦平面的出现,应将物镜头重新拉近载物台后再次调节焦距。②物镜没有转到正确位置,应对正后再观察。③标本位于视野之外,应移动标本片寻找观察对象,注意使载玻片上着色的部分进入视野。④找到的是错误的视焦平面,如载玻片的底部或盖玻片的上部。应转动细调节器寻找正确的标本视焦平面。⑤光线太强,尤其观察染色较浅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。⑥光线太暗。应重新检查光路。将反光镜转向光源,同时边镜下观察边调节反光镜方向,直到获得均匀明亮的照度;打开光圈,上升集光器,然后再观察。

3) 瞳距调节

移动两目镜的距离,使之与自己两眼距离相等。注意培养用双目观察标本的习惯,保持两眼同时睁开,练习将两眼视野重合,以产生立体视觉。有时为做到这一点需要一段时间的尝试。

如果视野内的亮度不合适,可通过升降集光器的位置、开闭光圈的大小或调节反光镜的位置来调整。自带光源的显微镜可通过亮度旋钮调节亮度。

3. 高倍镜的使用

(1) 用低倍镜找到清晰物像,且把需进一步观察的部位调到低倍镜视野中心后,才可换高倍镜继续观察。

(2) 眼睛从侧面注视物镜下端,用手转动物镜转换器把高倍镜置镜筒下方。注意勿使物镜下端碰到标本。显微镜在设计制造时将不同物镜设计成共焦点,即低倍镜对焦后,转换高倍镜时一般都能大致对准焦点并看到物像,但有时学生将标本放反,标本面在载玻片之下。这时低倍镜虽能找到视焦平面并观察标本,但换高倍镜时镜头有可能碰到载玻片,因此一定要用眼睛目送高倍镜到达正确位置。

(3) 使用目镜观察,同时微微来回转动细调节钮,直至视野内物像清晰为止。一般将低倍物镜换成高倍物镜观察时,视野要稍变暗一些,所以一般要对光线强弱重新调整。

如按上述操作后仍看不到清晰物像,或未看到想看的物像时,从以下情况寻找原因:①高倍镜没有卡到位,应重新调整位置后观察。②观察的部分不在视野内,应重新换回低倍镜观察,寻找到目标后,移到视野的正中央,再换高倍镜观察。③标本片放反了,应把标本片放正后,从低倍镜步骤开始重新操作。④有的显微镜高倍镜与低倍镜未

配套使用,若高倍镜的视焦过短,从低倍镜转换高倍镜时,镜头不能转到正常位置或撞坏标本;反之,若高倍镜的视焦过长,则转换后不能直接看到或使用细调节钮调节看到标本图像。如遇到这种情况,需要直接用高倍镜调焦。方法是:从侧面注视物镜,同时慢慢转动粗调节钮,使高倍镜头下降至与标本片最短距离。然后目视目镜视野,慢慢调节细调节钮,使镜头缓缓上升,直至物像清晰为止。注意勿使调节钮转动方向反了,若转动方向反了将会撞坏标本。

4. 油镜的使用方法

观察生物标本精细结构时需要使用油镜。油镜以香柏油或液体石蜡作为标本和镜头之间的光传播介质,可以明显提高对物体的分辨率,故油镜头的放大倍数比一般高倍镜大。

(1) 在使用油镜之前,必须先经低、高倍镜观察,然后将需进一步放大的部分移到视野的中心。在高倍镜视野中先将视焦调节清楚。

(2) 滴加镜油,转动物镜转换器,使高倍镜头离开通光孔,在玻片上需观察的部位滴加1滴香柏油。注意不要滴太多,以免造成镜油四处流淌,给操作和随后的清洗造成不便。

(3) 转换油镜,慢慢转动物镜转换器,在转换油镜时要从侧面仔细观察,注视油镜头与玻片的距离,使镜头能浸入油中而又不以压破载玻片为宜。使镜面浸在油滴中。

(4) 调焦,在一般情况下,转过油镜即可看到物像,缓慢转动细调节钮,即可使物像清晰。转动细准焦螺旋使载物台与镜筒分离时,若油镜已离开油滴,需在肉眼的监控下重新将油镜头浸入到镜油中。建议先在目视下使油镜头尽量贴近载玻片,然后再在目镜观察下转动细调节钮使镜头逐渐远离玻片来寻找视焦平面。不建议转动细调节钮使镜头逐渐贴近玻片来寻找视焦平面,以避免镜头与玻片相撞。在加油区内一般不能再使用高倍镜观察,以免镜油沾污高倍镜头。

(5) 调节孔径光阑和视场光阑。把孔径光阑开到最大,使与油镜的数值口径相匹配,通过调节视场光阑和照明度控制钮选择最适光线。

(6) 油镜使用后的处置。转动粗调节螺旋,使载物台远离镜筒,或使油镜头转到一边。取出标本玻片。对有盖玻片的标本片,用擦镜纸沾少量二甲苯或镜头清洗液擦去沾在油镜上的镜油,最后用擦镜纸擦净二甲苯。用液体石蜡作镜油时,可以只用擦镜纸即可擦净,不必用(或仅用极少量)二甲苯。对无盖片的标本片则要注意勿将玻片上的样品擦掉。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。也可以浸在二甲苯中把镜油洗去,然后晾干。

【注意事项】

(1) 持镜时必须是一手握臂、一手托座的姿势,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方;轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。

(2) 保持显微镜的清洁,光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭,切忌口吹手抹或用布擦,以免磨损镜面。机械部分可用布擦拭。观察带有液体的临时标本时要加盖片,不能使用倾斜关节,以免液体污染镜头和显微镜。

(3) 熟悉显微镜各部件性能, 掌握粗、细调节钮的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节钮向下时, 眼睛必须注视物镜头, 以免压坏标本和镜头。粗、细调节钮要配合使用, 细调节钮不能单方向过度旋转。

(4) 养成两眼同时睁开的习惯, 形成双眼视觉。

(5) 注意防止镜头碰撞玻片。使用高倍镜或油镜时, 如果需要更换玻片标本, 必须顺时针(切勿转错方向)转动粗调节器使载物台下降, 方可取下玻片标本。

(6) 不要长时间随意取下目镜, 以防止尘土落入物镜, 也不要任意拆卸各种零件, 以防损坏。

(7) 临时不用显微镜时只需将光源亮度调至最低而无需关闭。忌频繁开关显微镜电源。关闭光源前需将亮度调整到最低, 然后关闭电源。

(8) 使用完毕后, 要将玻片取出, 转动旋转器使镜头离开通光孔, 不能与通光孔相对。下降镜台, 平放反光镜, 下降集光器(但不要接触反光镜)、关闭光圈, 推片器回位, 盖上绸布和外罩。最后填写使用登记表。

(9) 镜头使用过油镜后, 须及时清洁镜头, 否则镜油变干会损害油镜头。

【教学建议】

(1) 本科生教学在学期开始的仪器介绍中, 首先介绍显微镜的基本使用方法。

(2) 在教师的引导下, 学生要了解普通光学显微镜的构造、基本原理、维护和保养的方法。

(3) 平时进行显微微观观察时注意遵守仪器使用规则, 每个人做到对显微镜的维护和保养。

【思考题】

(1) 为什么使用高倍镜和油镜时, 必须从低倍镜开始?

(2) 如何计算显微镜的放大倍数, 放大倍数与分辨率是否一致? 它们之间有什么关系?

(3) 简述使用显微镜的注意事项。

实验 2 荧光显微镜及其他特殊用途 显微镜的基本构造和使用方法

随着现代生物学技术与光学技术的发展, 光学显微镜的种类也越来越多, 性能也日益多样。已经研究出多种特殊功能的光学显微镜, 如荧光、相差、暗视野、干涉、微分干涉反差显微镜等。这些显微镜运用了不同的光学原理, 捕捉各种特殊的光; 或添加各种辅助外设, 使显微镜从单纯的形态学观察设备发展为与生物体功能研究相结合的综合性生物学研究设备。这些特殊功能显微镜多是在原有复式显微镜基本设计的基础上发展出来的, 保留了光学显微镜的基本功能, 不少设计是在基本构件基础上通过更换部件或添加特殊装置来实现特殊功能的。例如, 添加控温设备以便对活细胞进行动态观察。一些显微镜特别预留了备用接口以备将来增加显微镜的功能, 因此显微镜的构件化和系列