

■ 普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套用书

医学细胞生物学 实验教程

主编 朱海英

 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套用书

医学细胞生物学实验教程

Yixue Xibao Shengwuxue Shiyān Jiāochéng

主 编 朱海英

主 审 胡以平

编 者（以姓氏笔画为序）

汤 莹 第二军医大学

苏 娟 第二军医大学

李红枝 广东药学院

李建秀 第二军医大学

何志颖 第二军医大学

张艳芬 新乡医学院

邵志华 同济大学

谢东甫 第二军医大学

谢志芳 第二军医大学

訾晓渊 第二军医大学



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本书由来自于第二军医大学、同济大学、广东药学院、新乡医学院的中长期从事医学细胞生物学一线教学的骨干教师共同编写完成。

本教材以细胞生物学相关实验技术为主线,结合医学院校人才培养的需要,着重于学生基本知识、基本技能的训练目标,选取了显微镜的结构及使用、细胞基本形态结构观察、细胞化学、细胞生理、细胞培养技术、细胞的增殖与凋亡、细胞遗传学、细胞工程共八章内容,含37个实验,在每章的前言部分对该领域所涉及的基本技术及当前的最新进展作了介绍,并在附录中对每个实验所涉及的试剂配制和实验材料的准备都作了具体说明,供实验准备用。

本书是医学院校各专业本科生及专科生学习医学细胞生物学的基本实验教材,也可供相关专业研究生、教师、科研人员以及临床医生和药师使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验教程 / 朱海英主编. -- 北京:
高等教育出版社, 2012.7
ISBN 978-7-04-035750-9

I. ①医… II. ①朱… 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(2012)第141238号

策划编辑 席雁 责任编辑 席雁 封面设计 张楠 版式设计 史新薇
责任校对 刁丽丽 责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 三河市华润印刷有限公司
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 8.75
字数 200千字
插页 1
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版次 2012年7月第1版
印次 2012年7月第1次印刷
定价 19.90元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 35750-00

目 录

第一章 显微镜的结构及使用	1
实验 1 普通光学显微镜的结构及使用方法	2
实验 2 几种特殊显微镜的结构、原理及使用演示	7
实验 3 电子显微镜的种类、工作原理和超薄切片技术	13
第二章 细胞的基本形态结构观察	17
实验 4 细胞的基本形态结构观察和显微测量	17
实验 5 永久装片的制作和细胞器的观察	21
实验 6 细胞内线粒体和细胞核的分离、观察和鉴定	22
第三章 细胞化学	26
实验 7 细胞内酸性蛋白和碱性蛋白的显示与观察	28
实验 8 细胞内过氧化物酶的显示与观察	29
实验 9 细胞内酸性磷酸酶的显示与观察	30
实验 10 细胞内 DNA 和 RNA 的显示与观察	32
实验 11 细胞内微丝束的显示与观察	34
实验 12 免疫荧光技术显示和观察细胞内的中间丝	35
实验 13 超活染色显示和观察细胞内的线粒体	37
实验 14 双荧光染色显示和观察细胞内的线粒体和细胞核	38
第四章 细胞生理	40
实验 15 小白鼠腹腔巨噬细胞吞噬活动观察	40
实验 16 单细胞动物——草履虫生理活动观察	41
实验 17 溶血作用与红细胞膜的通透性	43
第五章 细胞培养技术	45
实验 18 细胞的原代培养和传代培养	45
实验 19 离体培养细胞的观察、计数与活力测定	49
实验 20 培养细胞的冻存与复苏	54
实验 21 培养细胞增殖动力学检测	56
第六章 细胞的增殖与凋亡	61
实验 22 细胞无丝分裂标本观察	61

目录 <<

实验 23 细胞有丝分裂标本观察	62
实验 24 细胞减数分裂标本制备与观察	65
实验 25 流式细胞术与细胞周期的测定	68
实验 26 细胞凋亡的检测	72
第七章 细胞遗传学	78
实验 27 动物细胞染色体标本的制备与观察	78
实验 28 人类染色体标本的制备及核型分析	81
实验 29 人类染色体 G 带显示	84
实验 30 核仁组织者区的银染显示与观察	86
实验 31 SCE 标本制备与观察	88
实验 32 微核检测技术	90
第八章 细胞工程	95
实验 33 细胞融合	95
实验 34 染色体提前凝集(PCC)的诱导和观察	97
实验 35 真核细胞的外源基因转染与表达检测	100
实验 36 胚胎操作与显微注射	103
实验 37 核移植	107
参考文献	111
附录一 实验室规则和注意事项	112
附录二 实验报告的书写要求	113
附录三 部分实验所需溶液的配制	114
附录四 实验用细胞悬液的配制	128
附录五 正常人染色体 G 显带标本特征分析	129

第一章 显微镜的结构及使用

显微镜(microscope)是将微小物体或物体的微细部分放大以便于观察的仪器或设备。由于细胞很小,并且结构复杂,因此对细胞形态的研究必须借助于显微镜。同时,显微镜的发明和不断改进也为细胞生物学研究的进一步深入奠定了坚实的基础。显微镜大致可分为光学显微镜、电子显微镜和扫描探针显微镜等。

光学显微镜(light microscope)是光学元件和精密机械元件的组合。光学显微镜有多种分类方法:①按使用目的可分为测量显微镜和观察显微镜。②按图像是否有立体感可分为立体视觉显微镜和非立体视觉显微镜。③按观察对象可分为生物显微镜和金相显微镜等。④按光学原理可分为偏光显微镜、相差显微镜和微分干涉相差显微镜等。⑤按光源类型可分为普通光学显微镜、荧光显微镜以及激光扫描共聚焦显微镜等。⑥按视野明暗可分为明视野显微镜和暗视野显微镜。⑦按物镜的位置可分为正置显微镜和倒置显微镜。在细胞生物学研究中使用较多的是普通光学显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、微分干涉相差显微镜、暗视野显微镜、激光扫描共聚焦显微镜等。

普通光学显微镜是结构最简单但最常用的显微镜,可用于观察物体的显微结构。荧光显微镜(fluorescence microscope)的光源采用高压汞灯,利用其发射的光激发样品中的荧光物质产生荧光,根据荧光的有无或强弱来研究样品的成分和含量。激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope)是20世纪80年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品。它是在荧光显微镜的基础上加装了激光光源和扫描检测装置,使用紫外光或可见光激发荧光探针,利用计算机进行图像处理,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像。它在亚细胞水平上观察诸如 Ca^{2+} 、pH、膜电位等生理信号及细胞形态的变化,成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具,是当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器。

电子显微镜(electron microscope)是20世纪30年代出现、20世纪60年代开始逐步应用于生物医学研究的仪器。电子显微镜利用电子束作为光源,大大提高了对物体的分辨率。目前较好的电子显微镜的分辨率为0.07~0.2 nm,比光学显微镜的极限分辨率(200 nm)提高了几千倍。随着制造技术、计算机技术等不断发展,电子显微镜得到了不断的改进,电子显微镜的种类明显增加,有透射电子显微镜、扫描电子显微镜、高压电镜、扫描透射电镜、分析电镜、扫描探针显微镜等,同时电子显微镜的性能也在不断的完善中。迄今为止,电子显微镜是进行细胞超微结构研究的最有力的武器。

扫描探针显微镜(scanning probe microscope)是一类全新的显微镜的总称,包括十余种类型:扫描隧道显微镜、原子力显微镜、扫描电容显微镜、扫描光子显微镜、扫描热显微镜、扫描离子显微镜、扫描声学显微镜、摩擦力显微镜、分子测深显微镜等。目前,在生物医学研究中得到广泛应用的是扫描隧道显微镜和原子力显微镜。扫描隧道显微镜是在1982年由

IBM 公司欧洲研究实验室的两位德国科学家 Gerd Binnig 和 Heinrich Rohrer 以量子力学中的隧道效应理论为基础研制而成的,它在表面垂直方向的分辨率达 0.005 nm,将人类的观察力提高了近两个数量级,使人类第一次能随心所欲地操纵排列原子,从而促使了一门新的学科——纳米学的产生。扫描隧道显微镜和原子力显微镜是纳米科学与技术研究领域十分重要的研究工具。

本章实验选取以下三部分内容:普通光学显微镜的结构及其使用、特殊光学显微镜的工作原理及使用以及电子显微镜的种类、工作原理和超薄切片技术。通过这一系列实验的学习,使读者对细胞形态结构的研究技术有一总体认识,并对细胞生物学研究中常用的显微技术有一定了解。

实验 1

普通光学显微镜的结构及使用方法

【目的要求】

1. 掌握普通光学显微镜的主要构造及其性能。
2. 掌握低倍镜和高倍镜的正规使用方法,反复练习,观察时保持两眼同时睁开和两手并用。

【实验用品】

1. 实验器具 光学显微镜、双层瓶(盛有二甲苯、香柏油)、拭镜纸。
2. 实验材料 “a”字装片、红绿羊毛装片、气泡装片。

【实验内容和方法】

一、光学显微镜的主要构造

光学显微镜的构造主要分为三部分:机械部分、照明部分和光学部分(图 1-1-1)。

(一) 机械部分

1. 镜座 是整个显微镜的基座。通常为马蹄形或长方形,用以支持整个镜体的平稳。有的显微镜在镜座内装有照明装置。
2. 镜柱 是镜座上方直立的部分,用以连接和支持镜臂。
3. 镜臂 是镜柱向上的弯曲部分,取用显微镜时握持的部位。有的显微镜在镜臂与镜柱之间有一活动关节,称为倾斜关节。可使镜筒向后倾斜,便于观察。
4. 镜筒 连在镜臂前方的圆筒,一般筒长为 160 mm。有的镜筒是固定不动的,有的镜筒可上下移动,在镜筒上端装有目镜,下端连接物镜转换器。
5. 调节器 是装在镜臂或镜柱上的大小两种螺旋,转动时可使镜筒或载物台上下移动,

以调节物镜和标本之间的距离,即调节焦距。

粗调螺旋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。

细调螺旋转动时升降幅度小,一般在用粗调螺旋调焦的基础上或在使用高倍镜时,用它作比较精确的调节,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。

6. 物镜转换器(旋转盘) 接在镜筒下端可自由旋转的圆盘,具有 3~4 个圆孔,物镜即装在这些圆孔里,转动旋转盘可调换不同放大倍率的物镜。当物镜转到工作位置时(即与光轴合轴),一定要将旋转盘边缘的缺刻和基座上的固定扣相扣合,否则无法观察标本。

7. 载物台 在镜筒下方的方形或圆形平台,用以放置玻片标本。平台中央有一圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。载物台上装有标本片推进器,其左侧弯形的弹簧夹是用来固定标本片的,转动右侧两个螺旋能向前后左右移动标本。有的推进器上还有刻度,可以计算标本推动的距离和确定标本的位置。

(二) 照明部分

在载物台下方装有一套照明装置,一般由集光镜、虹彩光阑和反光镜三者组成。

1. 反光镜 是一个一面平另一面凹的双面镜,位于镜柱基部或镜座中央的插孔中,可向任意方向转动。其作用是改变光源的方向使其反射到集光镜上,再经通光孔照明标本。反光镜的凹面聚光力强,适于光线较弱时使用,光线较强时,宜用平面镜。现在的光学显微镜大多采用内置光源,一般不需调节反光镜,故从显微镜外观上看不到反光镜。

2. 集光器 又称聚光器,位于载物台下方的支架上,由集光镜和虹彩光阑组成。利用镜台下方的调节螺旋可控制其升降,以调节光线的强弱。

(1) 集光镜 一般由两个或三个透镜组成,其作用相当于一个凸透镜,具有会集光线成束以增强照明度的功能。

(2) 虹彩光阑 位于集光镜下方,也叫光圈,由十几张金属薄片组成。其外侧伸出一柄,推动此柄可改变光阑孔径的大小,以调节通光量。有些显微镜的虹彩光阑下还装有滤光玻片支持框,可安放不同颜色的滤光玻片。

(三) 光学部分

1. 目镜 又称接目镜,装在镜筒的上端,通常由两个透镜组成。在上下透镜之间或在下透镜的下面装有一个用金属制成的光阑,由它决定视野的大小,故称视场光阑。在光阑的面上还可安装目镜测微尺和用人发粘贴在光阑上作为指针,用以指示观察目标。一架显微镜常备有 2~3 个目镜,上面刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等以示其放大倍数,可选择使用。一般常用的目镜倍数为 $10\times$ 。

2. 物镜 又称接物镜,装在物镜转换器上,一般有 3~4 个。物镜是由数片凸透镜和凹透镜严格组合起来的一组镜片。它是显微镜分辨性能高低的关键部件。通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数和镜口率(如 $10/0.25$ 、 $40/0.65$ 和 $100/1.25$),镜筒长度和所要求的盖玻片厚度(如 $160/0.17$)。

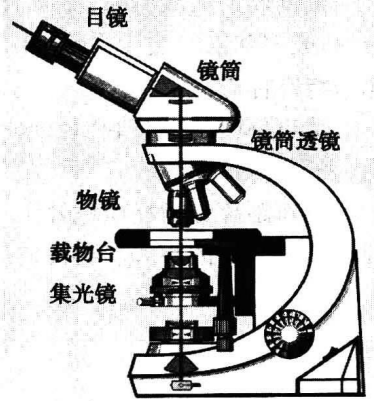


图 1-1-1 普通光学显微镜

第一章 显微镜的结构及使用

根据放大倍数不同,习惯上把 10 倍以下的物镜叫低倍镜,把 40 倍及以上的叫高倍镜,把 90 或 100 倍的油浸物镜叫油镜。为便于区别,在高倍镜和油镜上常用一圈不同颜色的线作为特殊标志。

镜口率(又称数值孔径, numerical aperture, N. A.)可以反映该物镜分辨率的大小,数字愈大,表示分辨率愈高。

工作距离是指显微镜处于工作状态(物像调节清晰)时,物镜最下面透镜的表面与盖玻片上表面之间的距离。物镜的放大倍数越大,工作距离越小(表 1-1-1)。

表 1-1-1 标准物镜的性质

放大倍数	镜口率(N. A.)	工作距离(mm)
10 ×	0.2	6.5
20 ×	0.50	2.0
40 ×	0.65	0.60
100 ×	1.25	0.20

显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜的放大倍数的乘积,如物镜 10 ×,目镜 10 ×,其放大倍数就为 $10 \times 10 = 100$ (倍)。

镜筒透镜(tube lens)是指无限远像距物镜必不可少的中间透镜。它是物镜系统的一部分,对此系统的有效放大率和校正状况有直接影响。

二、显微镜的使用方法

显微镜在使用前,应先检查它的各个部件是否完整和正常,并进行必要的清洁工作,然后将显微镜放置在自己左肩前方的实验台上,离桌子边缘 3 ~ 6 cm 为宜,镜筒直立的显微镜可使用倾斜关节,使镜筒略倾斜(一般不能超过 45°),以便观察。

(一) 低倍镜的使用方法

1. 对光 打开电源,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将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),打开光圈,旋转集光镜升降螺旋,使集光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度,两眼同时睁开,左眼从目镜中观察,同时调节光源入射角度,直到视野内的光线均匀,亮度适中为止。

2. 放置玻片标本 取一张玻片标本放在载物台上,有盖玻片的一面朝向物镜,固定在推进器的弹簧夹中,然后用右手转动推进器螺旋,把要观察的标本部位对准通光孔的中心。

3. 调节焦距 左手转动粗调螺旋,使低倍镜距玻片标本的距离小于 6 mm。注意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。然后两眼同时睁开,左眼在目镜上观察,左手慢慢转动粗调螺旋,使镜头上升或使载物台下降,当视野中出现物像时,再调节细调螺旋,直至视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可上下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(图 1-1-2)。

(二) 高倍镜的使用方法

1. 一定要先在低倍镜下找到要观察的标本物像后,再把需要放大的部分移至视野正中,

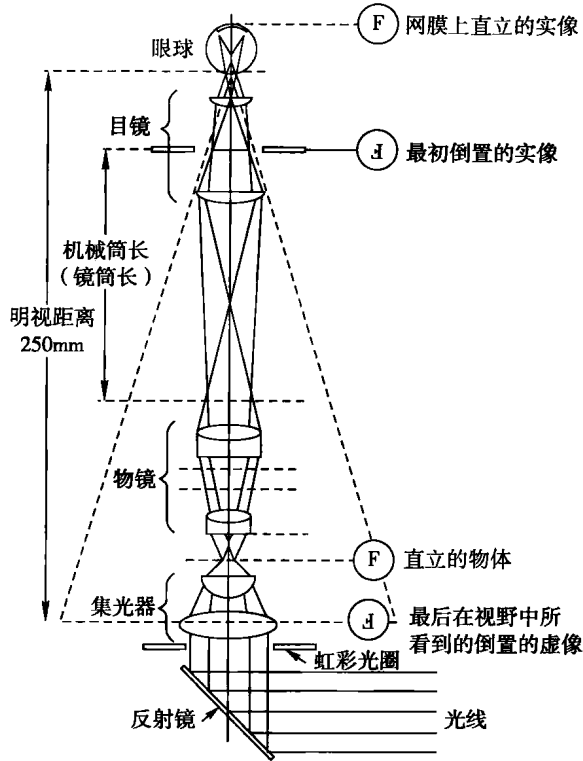


图 1-1-2 显微镜成像图解

并把物像调节到最清晰的程度。

2. 转动物镜转换器 直接转换高倍物镜即可见到视野中有不太清晰的物像,此时只要再慢慢向上或向下转动细调螺旋,即可得到清晰的物像。如果发生高倍镜头碰到玻片不能转换时,应检查原因(如低倍镜的焦距是否调好,标本片是否放反或物镜是否松动等),再重新操作。

(三) 油镜的使用方法

1. 在高倍镜下找到所要观察的标本后,将需要进一步放大的部分移至视野中心。
2. 把集光器上升到最高位置,光阑开到最大。
3. 转动物镜转换器,移开高倍镜,在要观察部位的盖玻片上滴加一滴香柏油作为介质(因香柏油的折射率和玻璃的折射率大致相同)。

4. 稍稍上升镜筒或下降载物台,转动物镜转换器使油镜对准通光孔,然后从侧面观察油镜与标本之间的距离,慢慢转动粗调螺旋,使油镜与油滴接触,再小心地使它贴近盖玻片表面。这步操作要特别注意,调节时速度不要过快。一般显微镜也可不上升镜筒,直接转换为油镜,油镜即可浸在油滴中。

5. 左眼观察目镜,同时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。如果是直接转换为油镜,则只要转动细调螺旋,稍微下降镜头或上升载物台,即能清楚观察到物像。切忌使用粗调螺旋,或在视野中看不到模糊物像时,一直单方向转动细调螺旋使镜头下降,这样会压碎玻片标本或损坏镜头。

6. 油镜使用完毕,必须把镜头和玻片标本上的香柏油擦净。先用拭镜纸蘸少许二甲苯将镜头上的大部分油去掉,再用干拭镜纸擦拭。擦拭时要顺镜头的直径方向,不要沿镜头的

第一章 显微镜的结构及使用

圆周擦。标本片上的油可用一张拭镜纸盖在片子的油滴上,然后在纸上滴一滴二甲苯,趁湿将纸往外拉,这样连续进行几次即可擦净。

三、使用显微镜的注意事项

1. 拿显微镜时,要一手紧握镜臂,一手托住镜座,不要单手提拿,以防目镜或其他零件滑落。

2. 显微镜不可放置在实验台边缘,以免碰翻落地。

3. 在使用倾斜关节时,倾斜角度不能超过 45° ,防止重心不稳而倾倒。如观察带有液体的装片标本时,则不能使用倾斜关节。因事离开座位时,必须将倾斜关节复原,镜头转离通光孔位置。

4. 不要随意取下目镜或拆卸显微镜的各种部件,以防灰尘落入内部或发生丢失、损坏等意外事故。

5. 使用显微镜时,操作要正规,养成两眼同睁、两手并用(左手操纵调节螺旋,右手操纵推片器)的习惯,边观察边计数和绘图等。

6. 要保持显微镜的清洁,发现有灰尘或操作中不慎使镜头和载物台沾上染料、水滴等,应及时擦去。光学和照明部分的镜面只能用拭镜纸轻轻擦拭,切勿用手指、手帕和绸布等擦摸,以免磨损镜面。机械部分可以用布擦拭。

7. 显微镜使用完毕,转动粗调螺旋上升镜筒或下降载物台,取下标本片,转动转换器使物镜离开通光孔,然后再下降镜筒或上升载物台使接近物镜,下降集光器,关闭虹彩光阑,复原倾斜关节和推片器位置,关闭电源。最后填写使用登记卡,把显微镜放回镜箱。

四、操作练习

要求按照显微镜的正规使用方法和注意事项,用下列标本反复练习各操作步骤。

1. “a”字装片 取一张“a”字标本片,先直接观察一下“a”字的方位和大小,再在低倍镜下观察。注意,视野中“a”字的方位发生了什么改变?移动标本的方向与视野中物像移动方向有何不同?

2. 红绿羊毛装片 取一张红绿羊毛标本片,先在低倍镜下观察,并将红绿羊毛交叉点移到视野中心,然后换高倍镜进行观察,利用细调螺旋的调节,分辨红羊毛和绿羊毛的上下位置。

许多显微镜的低倍镜视野中心与高倍镜视野中心往往存有一定的偏差,为使在高倍镜下能迅速找到所需放大部分的物像,可用红绿羊毛交叉点观察自己所使用的显微镜的偏心情况,并以图示记录下来(即偏心图)。观察的具体步骤是:当在高倍镜下找到红绿羊毛交叉点后,将其移到视野中心,然后换到低倍镜下观察交叉点是否仍在中心,如果偏离视野中心,其位置就是偏心位置,反复几次,将准确的位置记录在视野图形的相应位置上。以后要转换高倍镜观察标本之前,可先在低倍镜下把需要进一步放大的部位移到偏心位置上,这样欲需观察的目标就正好在高倍镜的视野中心。

3. 气泡装片 在显微镜下可见一些具有清晰黑色界限的环状物,内部无任何结构即为气泡。了解气泡的特征,在今后观察中不要把它误认为是所要观察的细胞。



【思考题】

1. 在调焦操作时,为什么低倍镜要先调到距标本片表面小于6 mm处,油镜一定要贴近

标本片表面?如果把标本片放反了,将会出现什么问题,为什么?

2. 在低倍镜调节焦距时,当视野中出现了能随标本片移动而移动的颗粒或斑纹,是否只要调节推片器将标本对准物镜中央,就一定能观察到标本的物像,为什么?
3. 你如何分析判断视野中所见到的污物点是否在目镜上?
4. 使用显微镜观察标本,为什么一定要按从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?
5. 在转动细调螺旋时,如已达极限转不动时,你应如何解决?



【作业】

1. 在低倍镜下已看到物像,在转换高倍镜时却直接转换不过来,试分析可能有哪些原因?
2. 回答思考题3和5。
3. 作出你所使用显微镜的偏心图。今后你再使用这架显微镜时,将如何利用该偏心图?

实验2 几种特殊显微镜的结构、原理及使用演示

【目的要求】

了解暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜的工作原理和使用方法。

【实验用品】

1. 实验器具 暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜(透射式和落射式)、激光扫描共聚焦显微镜、黑纸片、剪刀、圆规、无荧光镜油。
2. 实验材料 体外培养细胞、吖啶橙染色玻片标本、活细胞临时装片。

【实验内容和方法】

一、暗视野显微镜

(一) 原理和结构特点

在日常生活中,室内飞扬的微粒灰尘是不易看见的,但在光线暗的房间中若有一束光线从门缝斜射进来,灰尘便粒粒可见了,这是光学上的丁达尔现象,暗视野显微镜就是利用此原理设计的。它的结构特点主要是使用中央遮光板或暗视野集光器,常用的是抛物面集光

第一章 显微镜的结构及使用

器(图 1-2-1),使光源的中央光束被阻挡,不能由下而上通过标本进入物镜,从而使光线改变途径,倾斜地照射在观察的标本上,光遇到标本发生反射或散射,散射的光线投入物镜内,因而整个视野是黑暗的。在暗视野中所观察到的是被检物体的衍射光图像,并非物体的本身,所以只能看到物体的存在和运动,不能辨清物体的细微结构。但被检物体非均质,并大于 $1/2$ 波长时,则各级衍射光线同时进入物镜,在某种程度上可观察物体的构造。一般暗视野显微镜虽看不清物体的细微结构,但却可分辨 $0.004\ \mu\text{m}$ 以上的微粒的存在和运动,这是普通显微镜(最大的分辨力为 $0.2\ \mu\text{m}$)所不具有的特性,可用于观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

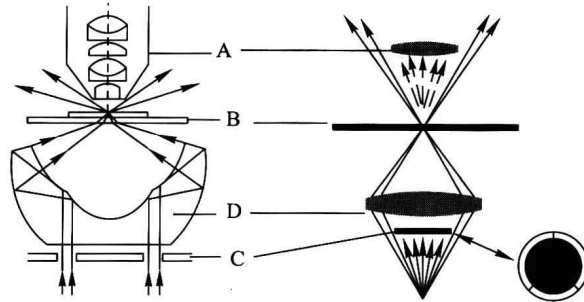


图 1-2-1 抛物面集光器照明时的路线图

A. 物镜 B. 标本 C. 环状缝隙 D. 暗视野聚光器

(二) 制作中央遮光板

普通显微镜只要聚光器是可以拆卸的,支架的口径适于安装暗视野聚光器,即可改装成暗视野显微镜。在无暗视野聚光器时,可用厚黑纸片制作一个中央遮光板,放在普通显微镜的聚光器下方的滤光片框上,也能得到暗视野效果。

1. 将显微镜集光器调到最高位置,用低倍镜对好焦距。

2. 取下目镜,从镜筒中观察并调节光阑的大小,使其与镜筒中所见物镜的视野相等。

3. 按照图 1-2-2 的形状,用厚黑纸剪制中央遮光板。外圆直径与滤光片框架相同,中央部分的大小与调节好的光阑孔径一样(可用半透明的小纸片,放在通光孔处集光镜镜面上,纸上显示的光斑即为光阑的孔径,再用圆规量取大小)。



图 1-2-2 中央遮光板

4. 将中央遮光板放在滤光片框架上,开大光阑进行样品观察。

如需使用高倍镜作暗视野观察,应按高倍镜对焦后的视野大小重新制作中央遮光板。保存好各自制作的中央遮光板,以便在后面的实验中使用。

(三) 使用方法

1. 把暗视野集光器装在显微镜的集光器支架上。

2. 选用强的光源,但又要防止直射光线进入物镜,所以一般用显微镜灯照明。

3. 在聚光器和标本片之间滴加一滴香柏油,目的是不使照明光线在集光镜上面进行全反射,到达不了被检物体,而得不到暗视野照明。

4. 升降集光器,将集光镜的焦点对准被检物体,即以圆锥光束的顶点照射被检物。如果集光器能水平移动并附有中心调节装置,则应首先进行中心调节,使集光器的光轴与显微镜

的光轴严格并于一直线上。

5. 选用与集光器相应的物镜,调节焦距(操作方法与普通显微镜相同),找到所需观察的物像。

(四) 观察

观察暗视野显微镜下的活细胞。在黑暗的背景里,可见细胞、细胞核和细胞器的衍射光图像。

二、相差显微镜

(一) 原理和结构特点

光波有振幅(亮度)、波长(颜色)及相位(指在某一时间上光的波动所能达到的位置)的不同。当光通过物体时,如波长和振幅发生变化,人们的眼睛才能观察到,这就是普通显微镜下能够观察到染色标本的道理。而活细胞和未经染色的生物标本,因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位有变化(相位发生的差异即相差),而这种微小的变化,人眼是无法加以鉴别的,故在普通显微镜下难以观察到。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。因此可用于观察活细胞或未染色标本。

相差显微镜(图1-2-3)与普通显微镜的主要不同之处是:用环状光阑代替可变光阑,用相差物镜(通常标有PH的标记)代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑,它们的直径和孔宽是与不同的物镜相匹配的。其作用是将直射光所成的像从一些衍射旁像中分出来。相位板安装在物镜的后焦面处,相位板装有吸收光线的吸收膜和推迟相位的相位膜。它除能推迟直射光线或衍射光的相位以外,还有吸收光使亮度发生变化的作用。调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时,聚光器下面的环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上,必须调节光阑的亮环和相板的环状圈重合对齐,才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱,应被吸收的光不能吸收,该推迟相位的光波不能推迟,就失去了相差显微镜的作用。

(二) 使用方法

相差装置为多功能系列显微镜中的附属装置,与普通显微镜配合使用。

1. 相差装置的调换安装 卸下普通显微镜使用的集光器,将环状光阑装在集光器支架上,把绿色滤光片放在上面,它可吸收红色和蓝色光,使照明光源成为波长范围小的单色光线,并有吸热作用,能使相差观察获得良好的效果。再从转换器上取下普通物镜,换上相差物镜。

2. 调焦 打开光源,旋转集光器转盘,将“0”对准标示孔,使普通集光器部分进入光路。先使用低倍相差物镜,按普通显微镜操作方法进行对光和调焦。

旋转环状光阑,使光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应,如相差物镜为40×时应用×10标示孔的光阑。

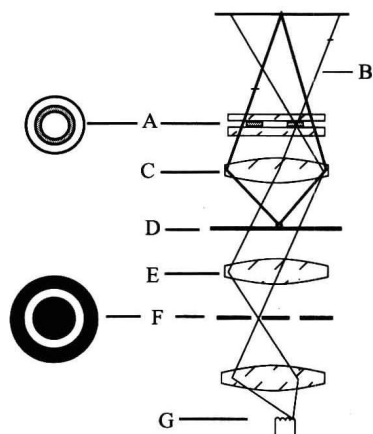


图1-2-3 相差显微镜图解

A. 相位板 B. 发生偏离的光 C. 物镜
D. 样本 E. 聚光器 F. 环状光阑 G. 光源

3. 合轴调整 拔出目镜,插入合轴望远镜,一边从望远镜向内观察,并用左手固定其外筒;一边用右手转动望远镜内筒使其下降,当焦点对准时就能看到环状光阑的亮环和相板的黑环,此时可将望远镜固定住。再升降集光器并调节其下的螺旋使亮环的大小与黑环一致,然后向左右前后方向调节环状光阑集光器上的调节钮,使两环完全重合(图 1-2-4),如亮环比黑环小而位于内侧时,应降低集光器使亮环放大,反之,则应升高集光器,使亮环缩小。如若升到最高限度仍不能完全重合,则可能是载玻片过厚之故,应更换。合轴调整完毕,抽出望远镜,换回目镜,按常规操作进行观察。

在更换不同倍率的相差物镜时,每一次都要使用相匹配的环状光阑且重新合轴调整。使用油镜时,集光器上透镜表面与载玻片之间要同时加上香柏油。

(三) 观察

倒置相差显微镜是观察培养活细胞的最有效的显微镜。它与一般相差显微镜的相异之处是光源和集光器装在上方,相差物镜装在载物台下方,便于观察在培养瓶中贴壁生长的活细胞。在倒置相差显微镜下观察培养瓶中的活细胞,可清楚地分辨细胞的形态,细胞核、核仁以及胞质中存在的颗粒状结构。

三、荧光显微镜

(一) 原理和结构特点

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(如紫外光 365 nm 或紫蓝光 420 nm)作为激发光激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后,再通过物镜和目镜的放大进行观察。这样在对比强烈的背景下,即使荧光很微弱也易辨认,敏感性高,主要用于细胞结构和功能以及化学成分等的研究(图 1-2-5,也见彩图)。

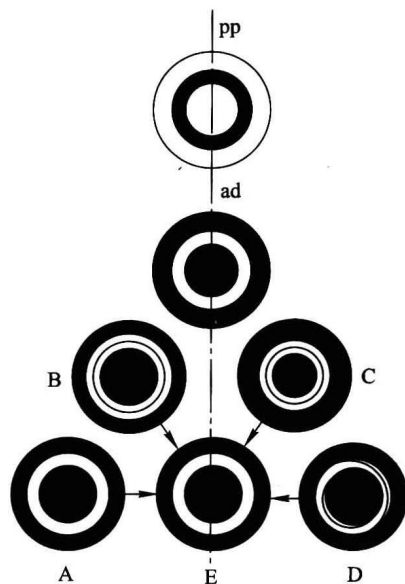


图 1-2-4 相差显微镜的合轴调整

pp. 相板 ad. 环状光阑

- A. 已合轴,但光束对环状光阑照射不均匀
 - B. 亮环大于相板圆环 C. 亮环小于圆环
 - D. 亮环和圆环不合轴 E. 合轴和照明正常
- (故 A. B. C. D. 不正确,要调节成 E)

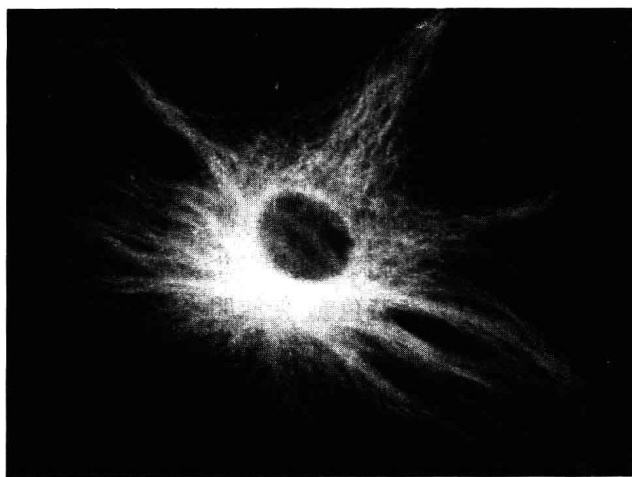


图 1-2-5 荧光显微镜下的细胞骨架(微丝)

荧光显微镜的基本构造是在普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等)的基础上组成的。荧光光源一般采用超高压汞灯(50~200 W),它可发出各种波长的光,但每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长,所以需加用激发滤片(一般有紫外、紫色、蓝色和绿色激发滤片),仅使一定波长的激发光透过并照射到标本上,而将其他光都吸收掉。每种物质被激发光照射后,在极短时间内发射出较照射波长更长的可见荧光。荧光具有专一性,一般都比激发光弱,为能观察到专一的荧光,在物镜后面需加阻断(或压制)滤光片。它的作用有二:一是吸收和阻挡激发光进入目镜,以免干扰荧光和损伤眼睛;二是选择并让特异的荧光透过,表现出专一的荧光色彩。两种滤光片必须配合使用。

荧光显微镜就其光路来分为两种:

1. 透射式荧光显微镜 激发光源是通过集光镜穿过标本材料来激发荧光的(图 1-2-6)。常用暗视野集光器,也可用普通集光器,调节反光镜使激发光转射和旁射到标本上,这是比较老式的荧光显微镜。其优点是低倍镜时荧光强,而缺点是随放大倍数增加其荧光减弱,所以用来观察较大的标本材料较好。

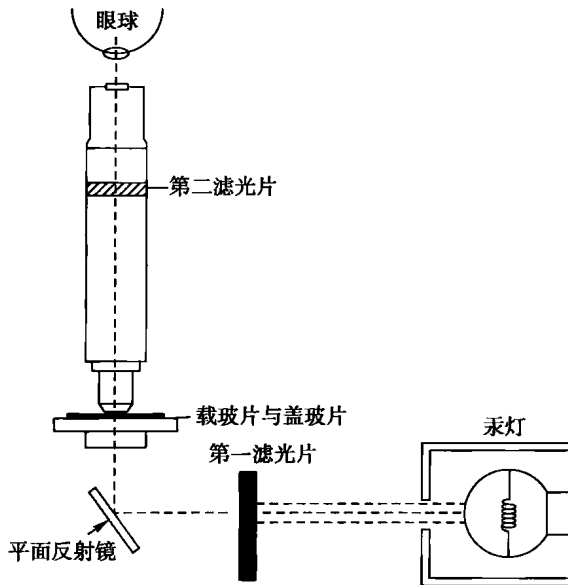


图 1-2-6 透射式荧光显微镜图解

2. 落射式荧光显微镜 该类型显微镜与透射式荧光显微镜不同之处是激发光从物镜向下落射到标本表面,即用同一物镜作为照明集光器和收集荧光的物镜(图 1-2-7)。光路中需加上一个双色束分离器,它与光轴成 45° 角,激发光被反射到物镜中,并聚集在样品上,样品所产生的荧光以及由物镜透镜表面、盖玻片表面反射的激发光同时进入物镜,返回到双色束分离器,使激发光和荧光分开,残余激发光再被阻断滤片吸收。如换用不同的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的组合插块,可满足不同荧光反应产物的需要。此种荧光显微镜的优点是视野照明均匀,成像清晰,放大倍数愈大,荧光愈强。

(二) 使用方法

1. 打开电源,超高压汞灯要预热几分钟才能达到最亮点。
2. 透射式荧光显微镜需在灯源与聚光器之间装上所要求的激发滤光片,在物镜的后面

装上相应的阻断滤片。落射式荧光显微镜需在光路的插槽中插入所要求的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的插块。

3. 用低倍镜观察,根据不同型号荧光显微镜的调节装置,调整光源中心,使其位于整个照明光斑的中央。

4. 放置标本片,调焦后即可观察。

使用中应注意:未装滤光片不要用眼直接观察,以免引起眼的损伤;用油镜观察标本时,必须用无荧光的特殊油镜;高压汞灯关闭后不能立即重新打开,需经5 min后才能再启动,否则会不稳定,影响汞灯寿命。

(三) 观察

荧光显微镜下(用蓝紫光滤光片),可见经0.01%的吖啶橙荧光染料染色的细胞,其细胞核和细胞质被激发产生两种不同颜色的荧光(暗绿色和橙红色)。

四、激光扫描共聚焦显微镜

(一) 原理和特点

激光扫描共聚焦显微镜的基本构造是由荧光显微镜、激光器、扫描检测装置和计算机组成的。它是以激光作为光源,激光的单色性、准直性、高能量及强穿透力使激光扫描共聚焦显微镜分辨率介于光镜与电镜之间。其工作原理是:由激光光源发射出的平行激光束被透镜及激光照明针孔聚焦为一个点光源,该点光源由计算机控制,可对样品内焦平面上的每一点进行扫描,由该点被激发出的荧光或反射光再沿着原发射光路由物镜、反光镜折射至检测针孔,由检测针孔将非聚焦激光产生的杂散信号全部滤去,而只保证该点的激光通过,并被检测针孔后的光电倍增管接收,利用计算机进行图像处理,从而获得细胞或组织内部微细结构的荧光图像(图1-2-8)。可以在亚细胞水平上观察生理信号及细胞形态的变化。

激光扫描共聚焦显微镜的特点是:

1. 激光扫描共聚焦显微镜能将杂散信号滤去,而仅接收所需的信号,克服了一般光学显微镜不能避免杂散信号干扰的缺点,其分辨率已接近光学显微镜的理论分辨率(200 nm),信号图像清晰度及对比度大大增加(图1-2-9,也见彩图)。
2. 由于激光穿透力极强,再辅以计算机处理的功能,使激光扫描共聚焦显微镜可探测到样品深层的信息,获得样品实时的三维结构图像。
3. 聚焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和检测针孔。

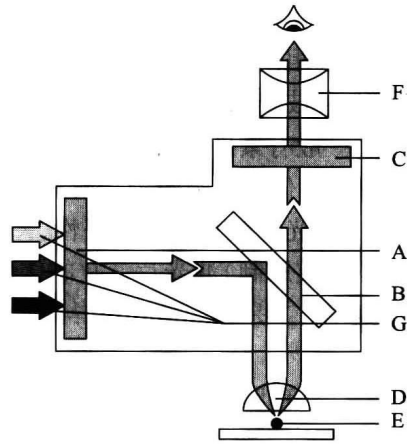


图1-2-7 落射式荧光显微镜图解

A. 激发滤光片 B. 双色束分离器 C. 阻断滤光片 D. 物镜 E. 标本 F. 目镜 G. 汞灯

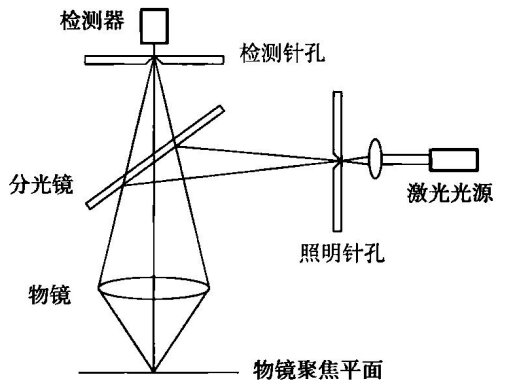


图1-2-8 激光扫描共聚焦显微镜图解