

国家级实验示范中心配套教材

细胞生物学实验

Cell
Biology
ExperimentS

肖义军 张彦定 主编



科学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞生物学实验

Cell

Biology
Experiment

周作刚 傅强 周 勇 编



科学出版社

国家级实验示范中心配套教材

细胞生物学实验

肖义军 张彦定 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书分为基础性实验和综合性实验两部分,其中基础性实验分为9章36个实验,是细胞生物学中最基本的实验技术。综合性实验6个,实验中需要综合应用多种研究技术,对培养学生的综合能力、动手能力、分析和解决问题的能力很有帮助。

本书可作为高等院校生命科学类专业本科细胞生物学基础实验课程的教材,特别适合师范院校生命科学专业的学生使用;也可供相关科研及实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验 / 肖义军, 张彦定主编. —北京: 科学出版社, 2012.7
国家级实验示范中心配套教材
ISBN 978-7-03-034718-3

I. ①细… II. ①肖… ②张… 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(2012)第121872号

责任编辑: 陈 露 封 婷 刘 晶 / 责任校对: 冯 琳
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 颀

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>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年7月第 一 版 开本: B5 (720 × 1000)

2012年7月第一次印刷 印张: 10

字数: 183 000

定价: 24.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《细胞生物学实验》编辑委员会

主 编 肖义军 张彦定

副主编 林凤屏

编 委 (按姓氏笔画排序)

叶祖云 朱 旻 刘静雯 许婉芳

李爱贞 肖义军 张彦定 林 董

林凤屏 金美芳 赵 林 徐贤柱

前 言

细胞生物学是生命科学的重要基础学科之一，也是高等院校生命科学相关专业的骨干课程之一。本质上，细胞生物学是一门实验科学，没有显微镜的发明，就不会有早期对细胞结构的揭示；没有各种现代分子生物学技术的发展和运用，也就无法深刻揭示各种细胞生命活动的分子机制。因此，搞好细胞生物学实验教学，对于学生正确理解细胞生物学的理论知识、把握细胞生物学学科发展的脉络和培养从事生命科学工作的能力是非常必要的。

目前细胞生物学学科发展迅猛，新的实验技术不断出现，但大部分学校的学生实验条件有限，无论是实验仪器、实验经费还是实验课时都难以满足日新月异的学科发展要求。如何在现有条件下充分发挥细胞生物学实验课的作用，是我们在编写本书时着力考虑的问题。

本书内容主要包括基础性实验和综合性实验两部分。基础性实验包括各种显微镜的使用、细胞形态和结构的观察、细胞化学、细胞膜生理、细胞分裂、细胞培养、生物大分子的原位检测、细胞的分选和分析及细胞凋亡的检测共 9 章 36 个实验，这里面既有传统的细胞生物学经典实验，也有现代细胞生物学研究的新技术、新方法，是最能代表本学科特点的实验方法和技术。综合性实验是在基础性实验基础上的多种研究技术的综合应用，实验难度相对较大，带有一定的探索性，需要认真操作、反复摸索才能将实验做好，对培养学生的综合能力、动手能力、分析和解决问题的能力很有帮助。本书主要面向师范院校生命科学专业的学生，因此我们在较为全面地考察了目前中学生物学教学现状的基础上，将涉及中学生物学教学内容的细胞生物学实验尽可能地编入了本书。

实验的可操作性也是我们在编写过程中重点考虑的问题，由于各学校的实验条件差别较大，对于可以采用多种方法进行的实验，我们尽可能地将各种实验方法编入，方便大家根据自身教学条件选择不同的方法。对于一些需要使用大型贵重仪器的实验，让每个同学上机操作可能不太现实，我们采取在原理部分进行较为详细的介绍及指导学生如何分析实验结果的方式来解决。此外，为了便于学生判断自己的实验结果是否达到预期目标，我们在每个实验内容中增加了一个实验结果部分，对理论预期结果进行简要描述。每个实验最后都附有思考题，引导学生思考，加深学生对实验原理、关键步骤等的理解。

实验 1、2、28、29 由许婉芳编写；实验 3、4、30~36 由林凤屏编写；实验 5、6、21、22、39 由叶祖云编写；实验 7、17、38 由林董编写；实验 8、10 由朱旻、

肖义军共同编写；实验 9、11、12、18、37、40 由肖义军编写；实验 13~16 由赵林编写；实验 19、20 由金美芳编写；实验 23 由朱旻编写；实验 24~26 由徐贤柱编写；实验 27、41 由李爱贞编写；实验 42 由刘静雯编写。

在本书的编写过程中，我们做了一些力所能及的新的尝试，但由于能力有限，以及编写时间较为仓促，本书还存在不少问题，敬请大家在使用过程中提出宝贵意见和建议。本书在编写过程中参考了大量国内外同行的资料，得到了众多师长朋友的帮助，在此深表谢意！

编 者

2012 年 3 月

目 录

前言

第 1 部分 基础性实验

第一章 显微镜技术	1
实验 1 普通光学显微镜及其使用	1
实验 2 光学显微镜标本的制作技术及 HE 染色	5
实验 3 特殊显微镜的原理和使用	8
实验 4 激光扫描共焦显微镜的原理与使用	22
实验 5 透射电镜的原理与使用	28
实验 6 扫描电镜的原理与使用	33
第二章 细胞形态与结构的观察	36
实验 7 不同细胞形态的观测及大小的测量	36
实验 8 线粒体和液泡系的活体染色与观察	40
实验 9 叶绿体的分离纯化与荧光观察	43
实验 10 考马斯亮蓝染色显示植物细胞骨架及其光镜观察	45
实验 11 间接免疫荧光标记法显示动物细胞中的微管	47
第三章 细胞化学	50
实验 12 甲基绿-派洛宁染色显示 DNA 和 RNA 在细胞中的分布	50
实验 13 Feulgen 反应显示细胞中 DNA 的分布	52
实验 14 PAS 反应显示细胞中糖原的分布	54
实验 15 脂类的细胞化学	56
实验 16 酶的细胞化学——酸性磷酸酶的显示	58
第四章 细胞膜生理	61
实验 17 活细胞与死细胞的鉴定	61
实验 18 细胞膜的通透性	65
实验 19 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬现象的观察	67
实验 20 植物凝集素对红细胞的凝集作用	70
第五章 细胞分裂及染色体标本的制备	72
实验 21 有丝分裂	72

实验 22 减数分裂	75
实验 23 植物根尖染色体标本制备	79
第六章 细胞培养	83
实验 24 动物细胞原代培养	84
实验 25 动物细胞传代培养	87
实验 26 动物细胞冻存与复苏	90
实验 27 植物细胞悬浮培养	92
第七章 核酸、蛋白质的原位检测	95
实验 28 原位杂交	95
实验 29 免疫组织与细胞化学技术	99
第八章 细胞的分选与分析——流式细胞技术	102
实验 30 流式细胞仪测定细胞周期	107
第九章 细胞凋亡的检测	110
实验 31 细胞凋亡的形态学观察	110
实验 32 凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳检测——DNA ladder	115
实验 33 凋亡细胞原位末端标记法检测——TUNEL	118
实验 34 流式细胞仪检测细胞凋亡	120
实验 35 线粒体膜电位检测细胞凋亡	126
实验 36 caspase-3 活性测定检测细胞凋亡	128

第 2 部分 综合性实验

实验 37 低温诱导植物根尖细胞染色体数目加倍	130
实验 38 动物细胞融合(PEG 介导的鸡血细胞融合)	133
实验 39 动物骨髓细胞染色体标本制作	135
实验 40 抑制肿瘤细胞增殖有效成分的筛选	138
实验 41 植物原生质体分离、融合与培养	141
实验 42 增殖细胞核抗原(PCNA)与海洋浮游植物生长之间的关系	144
主要参考文献	149

第 1 部分 基础性实验

第一章 显微镜技术

显微镜是观察细胞形态结构的基本工具，有了光学显微镜的发明才有细胞的发现，有了石蜡切片技术和各种染色技术的发明才使得对细胞的内部结构有了一定的认识，电子显微镜的发明和超薄切片技术的出现则加深了人们对细胞细微结构的了解。相差显微镜、微分干涉显微镜和显微操作仪的发明使得对活细胞的观察及外科手术操作变为可能。荧光显微镜在核酸和蛋白质等生物大分子的定位与定性研究方面发挥了重大作用。激光扫描共焦显微镜使得观察活细胞内各种细胞器和生物大分子的动态结构及活动成为可能。

显微镜是细胞生物学研究中最基本的实验工具。掌握显微镜的调试和使用的基本技能，了解各种不同的光学显微镜及电子显微镜的基本原理、特点和应用范围，对于细胞生物学的学习和研究是十分必要的。

实验 1 普通光学显微镜及其使用

【实验目的】

1. 了解普通光学显微镜的构造、基本原理、保养方法，掌握光学显微镜的使用方法。
2. 熟悉光镜下细胞的基本形态和结构。

【实验原理】

光学显微镜由光学放大系统和机械装置两部分组成。光学系统一般包括目镜、物镜、聚光镜、光源等；机械系统一般包括镜筒、物镜转换器、镜台、镜臂和底座等。标本的放大主要由物镜完成，聚光镜能使光线照射标本后进入物镜，形成一个大角度的锥形光柱。物镜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的视网膜上，形成一个正立的实像。判断显微镜性能最重要的指标是分辨率，它主要由物镜决定，实际使用中也与聚光镜相关。分辨率可用下式表示： $R=0.61\lambda/NA$ ， R 值越小，分辨率越大。 λ 为入射光的波长， NA 为物镜的数值孔径。 $NA=n \cdot \sin(\alpha/2)$ ， n 为介质的折射率， α 为镜口角的大小。

【实验用品】

1. 实验器具

普通光学显微镜。

2. 实验试剂

香柏油、镜头清洗液(乙醚:无水乙醇=7:3, 或二甲苯)。

3. 实验材料

各种动植物组织细胞或微生物永久装片或临时装片。

【方法与步骤】

1. 普通光学显微镜的基本构造

普通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,详见图 1-1。

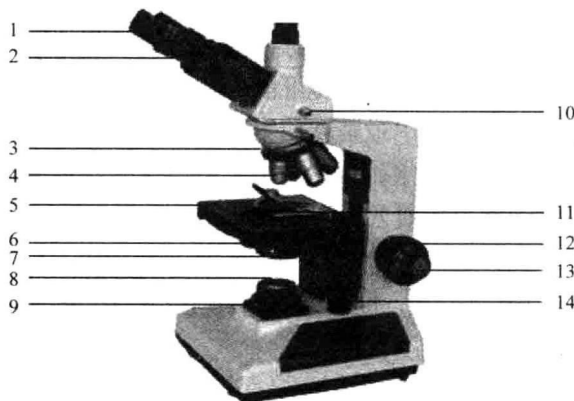


图 1-1 光学显微镜的基本构造

1. 目镜; 2. 视度调节; 3. 物镜转换器; 4. 物镜; 5. 载物台; 6. 孔径光阑调节杆; 7. 聚光镜; 8. 滤色镜座; 9. 集光器; 10. 镜筒固定螺丝; 11. 标本移动器; 12. 粗调焦手轮; 13. 细调焦手轮; 14. 载物台移动手轮

2. 显微镜的使用方法

(1) 聚光镜的使用方法

聚光镜是光学显微镜照明光路中的重要部件,聚光镜没有调整好会影响显微镜的实际分辨率,也使视野中因杂散光的存在而产生晕光。

1) 聚光镜的对中

①调出清晰的多边形:将视场光圈和孔径光圈调到最小的状态,若显微镜的状态正确,此时在视野中可以看到一个边缘清楚的多边形。否则,应转动聚光镜的上下调节旋钮,使聚光镜缓慢上升或下降,使得视场中形成一个边缘清晰的多边形。

注意:不要经常调节聚光镜高度。调节好高度后,以后都不要再移动其高低位置。显微镜安装好后,一般都已经调节好高度,所以可以直接进行下一步调节(如

果找不到多边形,可将视场光圈稍微放大,视野稍亮就可以找到)。

②多边形调到正中心:视野中多边形的正确位置应该是在视野的正中心,如果不在说明光路有偏移,需要调节聚光镜对中螺钉,使多边形位于视野的中心。

③多边形调成外切:将视场光圈慢慢放大,当多边形正好外切于视场时就是视场光圈的最好工作位置。此时,聚光镜的光轴与照明光路及成像光路的光轴合轴。调节好后,日常使用中不要随意调整对中螺丝杆。

2) 孔径光圈的调节:一般显微镜的聚光镜外侧边缘上均具有刻度及定位记号,便于调节聚光镜与物镜的数值孔径使其相匹配,以取得最佳的分辨率。低数值孔径的物镜要配合低数值孔径的聚光镜;反之,高数值孔径的油镜要配合高数值孔径的聚光镜。若聚光镜外侧没有标刻数字,则先将物镜聚焦,再取出一个目镜,眼睛往镜筒内看,可见物镜后透镜呈一明亮的圆,若看不见孔径光圈的轮廓像,说明孔径过大;若仅是一个很小的明亮轮廓像,则说明孔径过小。当缓慢增大孔径刚好使物镜后透镜呈一明亮圆时,则聚光镜与该物镜的数值孔径已相互匹配。

(2) 低倍镜的使用方法

1) 取镜和放置:显微镜平时存放在柜或箱中,用时从柜中取出,右手紧握镜臂,左手托住镜座,将显微镜放在自己左肩前方的实验台上,镜座后端距桌边3.3~6.6cm为宜,便于坐着操作。

2) 对光:用拇指和中指移动旋转器(切忌手持物镜移动),使低倍镜对准镜台的通光孔(当转动至听到碰叩声时,说明物镜光轴已对准镜筒中心)。打开光圈,上升聚光镜,调节光圈大小,调节自带光源的亮度旋钮以改变亮度,直到视野内的光线均匀明亮为止。

3) 放置玻片标本:取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。

4) 调节焦距:以左手按逆时针方向转动粗调节器,使镜台缓慢地上升至物镜距标本片约5mm处。应注意在上升镜台时,切勿在目镜上观察,一定要从右侧看着镜台上升,以免上升过多,造成镜头或标本片的损坏。然后,两眼同时睁开,在目镜上观察,左手顺时针方向缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。

如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心(注意玻片移动的方向与视野物像移动的方向是相反的)。如果视野内的亮度不合适,可通过升降聚光镜的位置或调整光圈的大小来调节。如果在调节焦距时,镜台下降已超过工作距离(>5.40mm)而未见到物像,说明此次操作失败,则应重新操作,切不可盲目地上

升镜台。

(3) 高倍镜的使用方法

1) 选好目标：一定要先在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心，同时把物像调节到最清晰的程度，再进行高倍镜的观察。

2) 转动转换器，调换高倍镜头：转换高倍镜时转动速度要慢，并从侧面进行观察(防止高倍镜头碰撞玻片)，如高倍镜头碰到玻片，说明低倍镜的焦距没有调好，应重新操作。

3) 调节焦距：转换好高倍镜后，用双眼在目镜上观察，此时一般能见到一个不太清楚的物像，可将细调节器的螺旋逆时针转动 0.5~1 圈，即可获得清晰的物像(此时切勿再用粗调节器!)。如果视野的亮度不合适，可用聚光镜和光圈加以调节。当需要更换玻片标本时，必须顺时针(切勿转错方向)转动粗调节器使镜台下降，方可取下玻片标本。

(4) 油镜的使用方法

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。

2) 将聚光镜上升到最高位置，光圈开到最大。

3) 转动转换器，使高倍镜头离开通光孔，在需观察部位的玻片上滴加一滴香柏油，然后慢慢转动油镜。在转换油镜时，从侧面水平注视镜头与玻片的距离，使镜头浸入油中而又不以压破玻片为宜。

4) 微调焦：一般情况下，从高倍镜转到油镜即可观察到物像，用双眼于目镜观察，并慢慢转动细调节器至物像清晰为止。转动过程中，油镜可能会离开油滴，此时，需要再小心地将镜头浸入油滴中，最好使镜头尽量贴近玻片，然后再微调使之逐渐远离玻片，防止玻片与镜头的碰撞。

如果不出现物像或者目标不理想要重找，在油区之外重找时的程序为：低倍→高倍→油镜；在油区内重找的程序为：低倍→油镜，此时不可使用高倍镜，以免油沾污镜头。

5) 调节孔径光圈和视场光圈，将孔径光圈调到最大，与油镜的数值孔径相匹配，再调节视场光圈和自带光源的旋钮以达到最佳亮度。

6) 油镜使用完毕，将载物台远离镜筒，先用擦镜纸蘸少许二甲苯将镜头上和标本上的香柏油擦去，然后再用干擦镜纸擦干净。

【注意事项】

1. 持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势，不可单手提取，以免零件脱落或碰撞到其他地方。

2. 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。

3. 保持显微镜的清洁，光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭，机械部分用布

擦拭。

4. 水滴、乙醇或其他药品切勿接触镜头和镜台，如果沾污应立即擦净。

5. 放置玻片标本时要对准通光孔中央，且不能反放玻片，防止压坏玻片或碰坏物镜。

6. 不要随意取下目镜，以防尘土落入物镜；也不要任意拆卸各种零件，以防损坏。

7. 使用完毕后，取下标本片，转动转换器使镜头离开通光孔，下降镜台，下降聚光镜，关闭光圈，推片器回位，盖上外罩，放回镜箱内。最后填写使用登记表。

【思考题】

1. 调节聚光镜及使用油镜时应注意哪些事项？
2. 为什么使用高倍镜和油镜时，必须从低倍镜开始？

实验 2 光学显微镜标本的制作技术及 HE 染色

【实验目的】

1. 掌握光学显微镜标本的制作方法。
2. 掌握 HE 染色标本的染色特点，了解 HE 染色的过程。

【实验原理】

光学显微镜的标本制作方法很多，常用的有：分离法、涂片法（血细胞、分离细胞或脱落细胞）、压片法、铺片法（疏松结缔组织可撕成薄片）、磨片法（牙和骨等坚硬组织可磨成薄片）、血管注射法、切片法，多数都需经过染色后才能在镜下观察。

石蜡切片是最基本的切片技术，冰冻切片和超薄切片等都是在石蜡切片的基础上发展起来的。苏木精（hematoxylin）与伊红（eosin）对比染色法（HE 染色）是组织切片最常用的染色方法。这种方法适用范围广泛，对组织细胞的各种成分都可着色，便于全面观察组织构造，而且适用于各种固定液固定的材料，染色后不易褪色，可长期保存。经过 HE 染色，细胞核被苏木精染成蓝紫色，细胞质被伊红染色呈红色。

【实验用品】

1. 实验器具

切片刀、切片机、恒温箱、显微镜、温度计、水浴锅、温台、熔蜡炉、蜡杯、酒精灯、蜡铲、展片台、解剖刀、解剖针、解剖剪、解剖盘、培养皿、吸管、镊子、单面刀片、台木、毛笔、包埋纸盒、染色缸、盖玻片、载玻片、玻片盘、树胶、树胶瓶。

2. 实验试剂

(1) Carnoy 固定液：甲醇：冰醋酸=3：1。

(2) Ehrlich 苏木精染液：取苏木精 1.0g，冰醋酸 5ml，乙醇 50ml，甘油 50ml，硫酸铝钾 5g，蒸馏水 50ml。将苏木精溶于少量的乙醇中，再加冰醋酸并搅拌，以加速其溶解。当苏木精溶解后将甘油加入并摇动容器，同时加入剩余的乙醇。硫酸铝钾需研磨并加热，然后溶解于蒸馏水中，将其逐滴加入染色剂中，并不断摇动，瓶口用纱布盖好，置于通风处，经常摇动以促其成熟，待颜色变为紫红色时即可使用，成熟时间需 2~4 周或数月之久。

(3) 伊红 Y 染液：伊红 Y 1.0g，蒸馏水 75ml，95%乙醇 25ml，冰醋酸 1 滴或 2 滴。先将少量蒸馏水加入伊红 Y 中，用研钵将伊红 Y 研碎溶解，再加入全部的蒸馏水，混匀溶解后，加入乙醇、冰醋酸。

(4) 甘油蛋白贴片剂：将 1 个鸡蛋打破入碗或杯中，去蛋黄留下蛋白，用玻棒调打成雪花状泡沫，然后用粗纸或双层纱布过滤到量筒中，经数小时或一夜，即可滤出透明蛋白液。然后加入等量甘油，稍稍振摇使两者混合。最后加入水杨酸钠 1g 作防腐用。可保存几个月。

(5) 1%盐酸乙醇液：浓盐酸 1 份，70%乙醇 99 份。

(6) 其他：各级乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%)，二甲苯，中性树胶。

3. 实验材料

鼠肝、肾等动物组织。

【方法与步骤】

1. 石蜡标本的制作

(1) 取材：断颈处死小鼠，迅速取材，组织块厚度不超过 0.5cm。

(2) 固定：将组织块浸入 Carnoy 固定液中进行固定，以保持其本来的结构。

(3) 制成蜡块。

1) 脱水：为了避免组织过度收缩，脱水过程应从低浓度乙醇开始，在 70%、80%、90%、95%的乙醇中各浸 6~12h，100%乙醇中 3~4h。

2) 透明：在二甲苯内至组织块透明为止。

3) 浸蜡：透明后的组织块放入熔化的石蜡中(56~60℃)，浸 2~3h，使石蜡充分浸入组织内部。

4) 包埋：先在模具中加入一些液态石蜡，待稍微冷却，然后再将待包埋的组织置于石蜡之中，并排列整齐，再将塑料模具盒盖上，最后加入少许液体石蜡，使石蜡变成固态。

(4) 切片和贴片：将包埋好的组织从模具上取下来并置于石蜡切片机上，切片机通过调节上下左右来使组织和切割方向一致，然后调节切片的厚度，一般为

5 μ m。如果比较难切,则可以适当调整厚度。用毛笔将切割的载玻片向外拉,并用小镊子将包含有完整组织的载玻片置于 40℃温水中。

(5) 染色:最常用的染色方法是苏木精和伊红染色,简称 HE 染色。

(6) 染色过程。

1) 去除石蜡:常温下于二甲苯中 40~60min。

2) 去除二甲苯:依次经过 100%、95%、90%、80%、70%乙醇各 3~5min。

3) 去乙醇:蒸馏水洗 5min。

4) 苏木精液:染 5~10min,标本呈淡蓝紫色。

5) 分化:0.5%盐酸乙醇分化数秒,至标本变为淡蓝色。

6) 返蓝:流水冲洗约 30min,镜检细胞质无色或淡蓝色,核蓝紫色。

7) 脱水:依次经 70%、80%、90%、95%乙醇脱水。

8) 伊红(乙醇伊红):染 1min,细胞质(嗜酸性)被染成红色。95%乙醇分化。100%乙醇脱水 2 次,各 5min。

9) 透明:乙醇二甲苯,5min;二甲苯 2 次,各 5min。

10) 封片:将透明的标本用树胶加盖封固。

2. 冰冻切片标本的制作

为了避免细胞、组织内的某些物质不被固定液所破坏;又要使组织变硬,便于切成较薄的薄片;同时又要快速得到切片,可将所获取的新鲜组织立即投入液氮(-196℃)内进行快速冻结。然后,再用恒冷箱切片机制成冰冻切片。将新鲜组织切成 1.0cm×1.0cm×0.2cm 后,置于液氮中速冻后(也可于-80℃保存备用),用 OCT 包埋剂包埋组织,立即在恒冷冰冻切片机内平衡温度至少 30min,冷冻头的温度为-25~-22℃,冷冻仓的温度-20~-18℃。将包埋好的样品固定在样品头上,切 4~6 μ m 厚的连续组织切片。冰冻切片后如不染色,必须吹干,密封后-20℃或-80℃保存;或进行短暂预固定后于冰箱内保存。利用这种方法制片迅速,细胞内酶的活性保存较好,故常用于酶组织化学染色。将冰冻切片室温晾干约 20min,于蒸馏水中浸洗 2min 后,从步骤 4) 开始进行染色。

【实验结果】

细胞核被苏木精染成蓝紫色,而细胞质被伊红染成红色。

【注意事项】

1. 组织脱水要充分,浸蜡要完全,刀片需锋利洁净,否则容易裂片或脱片。

2. 分化是 HE 染色成败的关键,若分化不当将导致染色不均。

3. 蓝化时以适量的流水冲洗使切片返蓝为宜,但过大的水流易使切片脱落。也可用碱性水。

4. 伊红染色的浓淡应与苏木精染细胞核的浓淡相应,使之对比鲜明。可在伊红乙醇液中滴加数滴冰醋酸助染,容易着色且经乙醇脱水时不易褪色。

5. 染色时间应根据染色液的成熟度及室温进行适当的缩短或延长。室温高时染色时间可短些, 冬季室温低时可在恒温箱中染色。

6. 封片时切勿使切片变干。需在切片上保留适量二甲苯, 及时滴上封片剂。封片用的中性树胶浓度需适度, 过稠的树胶难以伸展且易产生气泡, 影响封片。

【思考题】

1. 石蜡切片和冰冻切片各有哪些优缺点及适用范围?
2. 影响 HE 染色效果的主要因素有哪些?

附: 载玻片处理

将载玻片置于重铬酸钾和浓 H_2SO_4 混合液中, 目的是为了将载玻片上的硅胶等除去, 同时使一些肉眼看不见的凹凸不平的表面变平整, 便于组织吸附。然后置于清水中清洗, 除去残余的重铬酸钾和浓 H_2SO_4 (冲 1h 左右), 再将载玻片浸泡于乙醇之中, 然后放到架子上, 置于 37°C 温箱中。将多聚赖氨酸涂布于载玻片的表面, 由于 Lys 带正电荷, 而大多数的组织带负电荷, 从而产生吸附作用。也可以用甘油蛋白涂布于载玻片的表面。

实验3 特殊显微镜的原理和使用

3.1 暗视场显微镜

【实验目的】

掌握暗视场显微镜的原理、构造及其使用方法。

【实验原理】

1. 暗视场显微镜的设计原理

暗视场显微镜是基于丁达尔效应而设计的一种在黑色背景条件下观察被检样品的显微镜。聚光镜中央的光挡使入射光线不能自下而上地通过样品进入物镜, 因而视场是暗的, 但样品受到来自光挡边缘入射光的倾斜照射, 发出反射和散射光, 形成可见的明亮影像, 造成物像和背景的极大反差, 使样品更为明显, 更易观察。

受斜射光照射, 从样品的各种结构表面发射和散射光线, 可观察到许多细胞器的明亮轮廓, 如线粒体、细胞核、液泡及某些内含物等, 能够见到小至 $4\sim 200\text{nm}$ 微粒子的存在、运动和表面特征, 但不能分清其内部的细微结构。因此, 暗视场显微镜常用于观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

2. 暗视场显微镜的特殊构造

较之普通光学显微镜, 暗视场显微镜的特殊效果取决于其聚光镜, 聚光镜不同, 照明方法有别。常用的暗视场照明有下列两种方法。

(1) 暗视场光挡 (dark field stop)

暗视场光挡是由黑纸、厚卡纸或金属片制成, 置于聚光镜下方, 滤光镜托架