

全国高等中医药院校配套教材

供中医学（含骨伤方向）、针灸推拿学、中西医临床医学、康复治疗学等专业用

医学生物学实验

主编 吴勃岩

全国高等医药院校教材

供基础医学、预防医学、临床医学、口腔医学、公共卫生与预防医学专业用

医学生物学实验

第2版 下册

全国高等中医药院校配套教材
供中医学(含骨伤方向)、针灸推拿学、中西医临床医学、
康复治疗学等专业用

医学生物学实验

主 编 吴勃岩

副主编 赵丕文 孙 媛

编 者 (以姓氏笔画为序)

王艳杰 (黑龙江中医药大学)	赵丕文 (北京中医药大学)
刘 艳 (福建中医药大学)	姜海英 (南京中医药大学)
孙 媛 (大连医科大学)	梁 颖 (黑龙江中医药大学)
吴勃岩 (黑龙江中医药大学)	

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学生物学实验/吴勃岩主编. —北京: 人民卫生出版社, 2012. 6

ISBN 978-7-117-15858-9

I. ①医… II. ①吴… III. ①医学-生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①R318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 081189 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

医学生物学实验

主 编: 吴勃岩

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 尚艺印装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张:

字 数: 165 千字

版 次: 2012 年 6 月第 1 版 2012 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-15858-9/R · 15859

定 价: 15.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前 言

医学生物学是生命科学的主要分支学科,是研究人体生命现象和生命本质,探讨生物发生发展规律的科学,其着重研究医学相关的生物学问题,是医学与生物学相结合所形成的一门交叉学科。该学科的新理论和新技术推动了医学的发展,新技术、新方法不断涌现,对揭示疾病的发生机制起到了重要作用。医学生物学是在本科一年级开设的医学基础课,使学生在中学所学生物学的基础上,进一步学习、巩固和扩充生物学的基础理论和基本技能,并适当与临床医学知识相联系,使学生逐步地从整体水平、细胞水平、分子水平认识生物界发生发展的规律,同时,也将在教学中介绍生命科学的新进展,特别是对生命科学前沿的医学细胞生物学、医学遗传学、分子生物学等领域的新成就进行介绍,以扩大学生的知识面,使学生对生命科学中的新理论和新概念有所了解。

医学生物学是一门实践性很强的学科,实验课是教学的一个重要环节,它是培养学生动手能力、分析能力和创新能力的一个重要的、不可替代的手段,这就需要一本实用性、科学性的实验指导。

本书是全国高等中医药院校教材、卫生部“十二五”规划教材王明艳主编的《医学生物学》的配套教材,由几所高等医学院校长期从事医学生物学的教师共同编写,结合各校开设医学生物学实验课的实际情况共编写 22 个实验。实验一、二、四、十三由刘艳编写;实验三、十一、十二由赵丕文编写;实验五、六、七、八、九、十五由王艳杰编写;实验十、十六由姜海英编写;实验十四、十八由吴勃岩编写;实验十七、十九、二十由孙媛编写;实验二十一、二十二由梁颖编写。编写过程中着重阐述了医学生物学实验中的基本操作、基本技能和基本理论以及临床应用,力求在培养学生动手能力的同时,培养学生独立思考和综合分析的能力以及创新意识,全面提高学生的综合素质。各学校可以根据教学课时和实验条件选择实施本书的实验项目。

本书适用于高等中医药院校中医学、针灸推拿、康复、中西医结合临床等专业医学生物学、医学细胞生物学、医学遗传学课程的实验教学,也可供生物技术、生物工程、生物制药技术、食品生物技术等多种生物类专业的本、专科学生使用与参考。

本教材的编写得到了编者所在院校和人民卫生出版社的大力支持,得到南京中医药大学王明艳教授给予的热情帮助,在此一并表示衷心地感谢!

由于编者的知识能力和时间所限,书中不当之处在所难免,恳请读者提出宝贵意见,以便再版时修正。

编 者

2012 年 5 月

目 录

实验一 光学显微镜结构与使用方法	1
实验二 细胞基本形态与结构的观察	8
实验三 细胞核和线粒体的分级分离与鉴定	14
实验四 光镜下细胞器与细胞有丝分裂的观察	18
实验五 线粒体的活体染色与观察	22
实验六 细胞骨架的观察	25
实验七 细胞组分的化学反应	30
实验八 细胞融合	36
实验九 细胞生理活动的观察	39
实验十 哺乳动物细胞体外培养技术	43
实验十一 蟾蜍解剖方法	50
实验十二 家兔解剖方法	55
实验十三 小鼠骨髓细胞染色体标本的制备与观察	60
实验十四 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核标本的制备与观察	64
实验十五 人类间期细胞性染色质标本的制备与观察	67
实验十六 小鼠睾丸精母细胞减数分裂标本的制备与观察	71

实验十七 人类外周血淋巴细胞培养与染色体标本的制备与观察·····	76
实验十八 人类非显带染色体核型分析 ·····	81
实验十九 染色体 G 显带技术 ·····	85
实验二十 姐妹染色单体交换标本的制备与观察·····	92
实验二十一 人类遗传性状及 PTC 尝味能力分析 ·····	97
实验二十二 人类指、掌皮纹的分析 ·····	101
主要参考书目 ·····	106

实验一 光学显微镜结构与使用方法

【实验目的】

1. 熟悉光学显微镜的主要构造和性能,了解光学显微镜的成像原理。
2. 掌握低倍镜、高倍镜及油镜的使用方法。
3. 了解暗视野显微镜及荧光显微镜的使用方法。

【实验用品】

1. 材料 红绿羊毛装片、英文字母装片、头发交叉装片。
2. 器材和仪器 普通光学显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、擦镜纸。
3. 试剂 香柏油或液状石蜡、二甲苯。

【实验原理】

光学显微镜(light microscope)简称光镜,是利用光学原理把人眼所不能分辨的微小物体放大成像,以供人们获得微细结构信息的光学仪器。历史上光镜的发明使人类对世界的认知进入微观领域,是自然科学的一次飞跃式发展。迄今为止,显微镜的使用已有 400 多年的历史。随着认知水平的不断提高,显微镜的功能与类型也在逐步完善,目前除了广泛使用的普通光镜外,还有暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜和倒置显微镜等有特殊功能或用途的光镜。光镜是生物科学和医学研究领域常用的仪器,已经成为人们了解微观世界不可或缺的工具。

1. 光学系统 是光学显微镜的核心部件,透镜是组成该系统最基本的光学组件。物镜、目镜及聚光镜等部件均由单个和多个透镜组成。依其外形的不同,可分为凸透镜和凹透镜,物镜和目镜都相当于一个凸透镜。

凸透镜的成像规律是:当物体位于透镜二倍焦距以内、焦点以外时,则在另一侧二倍焦距以外形成放大的倒立实像;当物体位于透镜焦点以内时,则在另一侧不成像,而在物体的同侧方向比物体远的位置形成放大的正立虚像。

2. 显微镜的成像原理 显微镜就是利用上述规律将物体放大的。标本在物镜下方一倍和二倍焦距之间,则在物镜上方的二倍焦距以外形成放大的倒立实像。经过精确的设计,这个放大倒立的实像刚好落在目镜下方的一倍焦距之内,使得这个放大倒立的第一次像,又被目镜再一次放大,最终在目镜下方(第一次像的同侧)、人眼的明视距离(25cm)处形成放大的正立(相对于第一次像而言)的虚像。因此,当我们镜检时,通过目镜看到的像与原物体的像方向是相反的(图 1-1)。

3. 显微镜的性能和质量 显微镜的性能和质量的高低可通过分辨率、数值孔径、放大率、焦点深度和视场宽度等指标来反映。

(1) 分辨率(resolving power, R):即显微镜的分辨本领,是指显微镜或人眼在 25cm 的明视距离处,能清楚分辨被检物体两点间最小间隔的能力。它主要由物镜的分辨率决定,与目镜无关。人眼的分辨率约为 0.1mm,而光镜的分辨率可达 0.2 μ m。一般来说,通过降低入射光的波长、提高介质折射率和增大孔径角可提高显微镜的分辨率。

(2) 数值孔径(numerical aperture, N.A):又叫做镜口率,是决定显微镜分辨率的重要参数。其大小由下式决定: $N.A = n \times \sin(a/2)$,数值孔径越大,表示显微镜分辨率越高。

(3) 放大率(minifying power):即放大倍数,显微镜的放大倍数是物镜的放大倍数和目镜的放大倍数的乘积。常用显微镜的最大放大倍数一般为 1600 倍。放大率也是显微镜的重要参数,但也不能盲目相信放大率越高越好,在选择时应首先考虑物镜的数值孔径。

(4) 焦点深度(depth of focus):简称为焦深,即在使用显微镜时,当焦点对准某一物体时,焦点平面上下影像清晰的距离或范围。焦深大,可以看到被检物体的全层,而焦深小,则只能看到被检物体的一薄层,焦深与放大倍数及物镜的数值孔径成反比,焦深大,分辨率降低。

(5) 视场宽度(field of view):也称视场直径,是指在显微镜下看到的明亮圆形视场内所能容纳被检物体的实际范围。物镜的倍数增大,视场宽度则减小。

【实验内容与方法】

(一) 普通光学显微镜的结构

普通光镜的构造分为两大部分:机械部分和光学部分(图 1-2)。

1. 机械部分 显微镜的机械装置包括镜座,镜柱,镜臂,镜筒,载物台,推片器,物镜转换器,粗、细准焦螺旋等部件。

(1) 镜座(base):镜座是显微镜的底座,用以支持整个镜体,与镜柱相连,在它的上面装有载物台、照明灯和准焦螺旋,镜座通常用来安放照明光路系统。

(2) 镜柱(post):是镜座上面直立的部分,用以连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂(arm):与镜柱相连的弯曲状结构,是取显微镜时的握持部位。

(4) 镜筒(tube):是安装在镜臂前方的圆筒状结构或方形结构,其上端装有目镜。

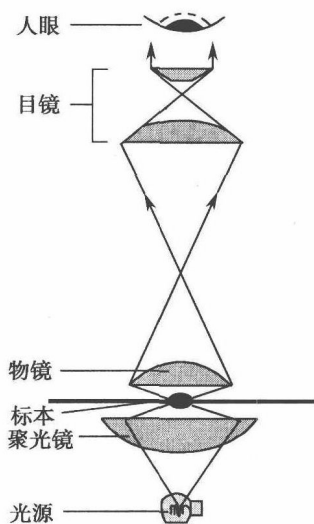


图 1-1 光学显微镜的成像原理

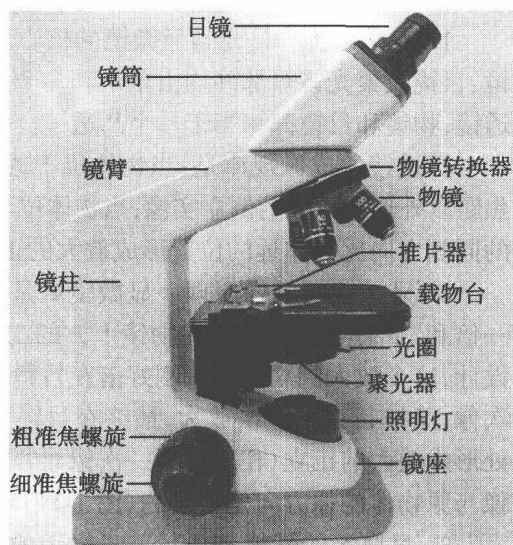


图 1-2 普通光学显微镜的结构

(5) 载物台(stage):是位于物镜转换器下方的黑色方形平台,用于放置被观察的玻璃标本。载物台的中央有一圆孔称为通光孔,是用来通透光线的,自下方的光线经此孔照射到标本上。载物台装有推片器用于固定和移动玻片标本,载物台右下方(使用者方向)的上下两个螺旋可以移动推进器,可使标本在水平面上前后左右移动,用来寻找目标。

(6) 物镜转换器(revolving nose-piece):又称物镜转换盘,是安装在镜筒下方的圆盘状结构,可以顺时针或逆时针方向转动,一般物镜转换器上安装3~4个物镜,变换需要的物镜要通过转动物镜转换器来进行,不可直接掰镜头。转动转换器使需要的物镜垂直向下正对通光孔达到光路合轴,此时可听到“咔”的一声。

(7) 准焦螺旋(focusing adjustment):也称调焦螺旋,装在镜座左右两侧的调节焦距的装置,分粗准焦螺旋和细准焦螺旋两种。粗准焦螺旋可使载物台以较快速度上升或下降,适用于低倍镜观察时的调焦,而细准焦螺旋只能使载物台缓慢地上升或下降,适用于高倍镜和油镜的聚焦,一般在粗准焦螺旋调焦的基础上使用。

2. 光学部分 光学系统是显微镜最重要的部分,通常由目镜、物镜、聚光器和光圈组成。

(1) 目镜(ocular):安装在镜筒的上端,作用是把物镜放大的实像再放大一次。目镜中通常安装有一小段细金属丝作为指针,用以指示视野中的某一部分。另外,还可在目镜筒的下方安装目镜测微尺。每台显微镜通常配置2~3个目镜,如“5×”、“10×”和“15×”(数字表示放大倍数)目镜,可根据不同需要选择不同放大倍数的目镜,最常使用的是“10×”目镜。

(2) 物镜(objective):安装在物镜转换器上。每台光镜一般装有3~4个不同放大倍数的物镜,物镜是显微镜最主要的光学部件,决定着光镜分辨率的高低。常用物镜的放大倍数有4×、10×、40×、100×等几种。一般将4×称为放大镜,10×的物镜称为低倍镜,40×的称为高倍镜;100×镜头在使用时其顶端需浸在液状石蜡或香柏油中使用,故称为油镜。

物镜侧面通常标有能反映其主要性能的参数(图1-3),主要有放大倍数、数值孔径、镜筒长度、所需要的盖玻片厚度和工作距离等。放大倍数如10、40和100;数值孔径的值一般标在放大倍数的后面,以/隔开,如10/0.25、40/0.65和100/1.25;镜筒长度表示从目镜

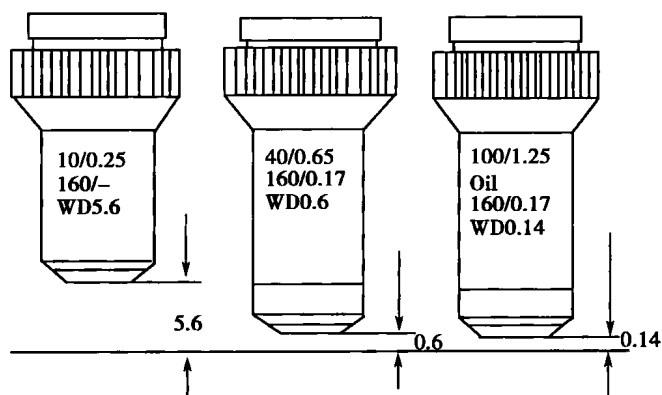


图1-3 物镜的主要性能参数(注:镜筒长度、载玻片厚度、工作距离单位均为mm)

筒上缘到物镜转换器螺旋口下缘的距离,一般为160mm,高倍以上的物镜头要求的盖玻片厚度为0.17mm,镜筒长度和盖玻片厚度一般标在一起,并用/隔开,如160/0.17;工作距离表示显微镜的焦距已调好,物像在最清晰的时候,此时物镜的下表面和盖玻片之间的距离,10×、40×、100×物镜的工作距离分别为5.6mm、0.6mm和0.14mm,标志为WD5.6、WD0.6和WD0.14。物镜放大倍数越大,其工作距离越小。不同放大倍数的物镜也可从外形上加以区别,一般来说低倍镜最短,油镜最长,而高倍镜的长度介于两者之间。另外,在油镜上还常标有“oil”字样。

油镜在使用时需要香柏油或液状石蜡作为介质,这是因为油镜的镜孔很小,而光线要通过载玻片、盖玻片和一段空气才能进入物镜中,玻璃与空气的折射率不同(玻璃的折射率一般为1.65~1.78,空气为1),使部分光线产生折射而损失掉,不仅使进入物镜的光线减少,降低了视野的照明度,而且会减少镜口角,使得物像模糊,分辨率降低;在标本之上和油镜头之间填充香柏油或液状石蜡时(香柏油、液状石蜡的折射率分别为1.51和1.46),由于其折射率与玻璃相近,光线经过载玻片后可直接通过香柏油或液状石蜡进入物镜而少发生折射,不仅增加了视野的照明度,更重要的是通过增加数值孔径达到提高分辨率的目的。

(3) 聚光器(condenser):聚光器在载物台下面,其上安装有光圈。

聚光器的作用是将光线集中到所观察的样品上,载物台左下方有一调节螺旋或手柄可以使聚光器上升或下降,上升时光线增强,下降时光线减弱,通过聚光器高度的调节,可以使得标本得到最强的照明,获得清晰明亮的物像。

(4) 光圈(aperture):也叫虹彩光圈或孔径光阑,安装在聚光器上面,是镜头中的重要机械装置,光圈的外侧安装有一小手柄,推动手柄可以调节光圈孔径的大小,以调节进光量。

(二) 普通光学显微镜的使用

1. 观察前的准备工作 显微镜一般放置在显微镜柜或镜箱内,取显微镜时,一手紧握镜臂,另一手托住镜座,平稳地将显微镜搬运到实验桌上,切不可一只手提起,以免坠落和甩出目镜。将显微镜放在自己身体的左前方,离桌子边缘约5cm,右侧放绘图纸。

2. 低倍镜的使用 显微镜的使用一定从低倍镜开始,要注意养成先用低倍镜观察的习惯,因为低倍镜视野较大,易于发现和确定检查的目标。低倍镜的使用按以下步骤进行:

(1) 对光:打开显微镜电源,转动物镜转换器,将低倍镜对准通光孔,聚光器升到最高,将聚光器上的光圈打开到最大位置,然后双眼观察目镜,同时调节光源的亮度,使视野内的光线均匀、亮度适中。

(2) 放标本:取需要观察的标本,先对着明亮处肉眼观察标本的全貌和位置,再将其放置到载物台上,一定要注意正面向上(注:正面一般是有盖玻片的那一面,若无盖玻片或无标签标示,取玻片对光线处观察,粗糙的一面为正面,光滑的为反面),拨开推片器上的弹簧夹,将标本平推进推片器将其固定好,然后转动推片器调节螺旋,使需要观察的标本部位处于通光孔的中央位置。

(3) 调焦:侧面观察,转动粗准焦螺旋,上升载物台使得标本和低倍镜的距离约5mm,然后双眼看目镜,转动粗准焦螺旋慢慢降下载物台,直到物像出现、视野清晰。用推片器移动标本,找到合适的对象并将它移到视野中央进行观察。

如果在低倍镜视野中找不到物像,可能有两个原因:①升降载物台的速度过快,焦距没有调好;②标本不在视野中,可能因为标本太小或标本颜色太浅而不易寻找到标本,这时可通过调节聚光器和光圈使得视野变暗,反差增大,然后移动推片器仔细寻找标本。

3. 高倍镜的使用 由于高倍镜的观察视野要小于低倍镜的视野,所以在使用高倍镜前,应先在低倍镜视野寻找到需观察的目标,并将其移至视野中央,然后转动物镜转换器,使高倍镜转到工作状态(高倍镜头垂直向下对准通光孔),此时,视野中一般可见到不太清晰的物像,只需调节细准焦螺旋便可使物像清晰。

目前大多显微镜的低倍、高倍镜头是同焦的,所以当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需用细准焦螺旋稍稍调节焦距便可获得清晰的物像。但若玻片放反了,直接转换高倍镜时会发生高倍镜镜头碰擦玻片的情况,此时不能硬转,应充分检查是否因为玻片放反、玻片过厚等原因,排除后再进行高倍镜调焦观察。

少数情况下,观察者使用的是不同型号的物镜,即低倍、高倍镜头是非同焦的,这时在转换高倍镜时要从侧面观察,可稍稍降下载物台,避免镜头与玻片相撞,然后从目镜观察,调节视野亮度,缓慢调节粗准焦螺旋,使载物台上升,直至物像出现,再用细准焦螺旋调至物像清晰为止。

学生实验一般在高倍镜情况下即可进行大部分标本的观察,在观察时,可将视野看成一个带有时间标记的钟面(如3、6、9、12点钟),如果目镜中装有指针的话,可用指针对准有疑问的目标同老师和同学交流。

4. 油镜的使用 首先要注意,在使用油镜前,要先经低倍镜、高倍镜找到清晰的需观察的目标后方可继续使用油镜观察。由于油镜放大倍数高于高倍镜,所以其视野要小于高倍镜视野,因此,在转换油镜前,先在高倍镜视野中找到需观察的目标并将其移到视野中央,转动物镜转换器,移开高倍镜,在玻片标本上需观察的部位滴一滴香柏油或液状石蜡,然后在眼睛的注视下,将油镜转至工作状态(即垂直向下正对通光孔),此时要特别细心,油镜的工作距离很短,一般在0.2mm以内,注意避免压碎标本而使物镜受损。油镜到位后,双眼注视目镜,小心而缓慢地转动细准焦螺旋,直至视野中出现清晰的物像,此时可调节聚光器的高度并将光圈开至最大以增强视野亮度。

使用油镜时,有时不可进行同高调焦,因为有时油镜头不是显微镜的原配物镜,或因为标本片太厚,进行同高调焦时,转换油镜可能会碰到玻片。这种情况要特别小心,在眼睛的侧面观察下,可先稍稍下降载物台,转动物镜转换器使油镜转到工作状态,再小心上升载物台使油镜下端浸入油滴中,然后双眼注视目镜,小心而缓慢地转动细准焦螺旋使载物台上升或下降,直至视野中出现清晰的图像。操作时谨记转动速度要慢,以免镜头下降压碎标本或损坏镜头。

油镜使用结束后,必须及时将镜头上的油擦拭干净。擦拭前,应将载物台下降约1cm并将油镜头转离通光孔,擦拭时,一般要擦3~4遍,先用干擦镜纸擦一次,把大部分的油擦掉,再用蘸有少许二甲苯的擦镜纸擦两次,最后再用干擦镜纸擦一次。

5. 显微镜的还原 显微镜使用结束后应及时还原,先下降载物台,取下标本片,转动物镜转换器使物镜转离通光孔,使所有物镜均处于非工作状态,然后,上升载物台,使物镜与载物台相接近,下降聚光器,关闭光圈,关闭光源。最后,用柔软纱布清洁载物台等机械

部分,将显微镜放回柜内或镜箱中。

(三) 暗视野显微镜的使用

暗视野显微镜(dark-field microscope)与普通光镜的唯一区别在于两者的聚光器不同。暗视野显微镜的聚光器中央装有一个不透光挡板,光线不能自下而上直接通过标本,只能从挡板边缘斜射到标本上,因光线是斜射的,不直接进入物镜,所以视野背景是黑暗的,而标本遇光发生散射,散射的光线投入物镜内,这样可在暗视野中见到明亮的物像。暗视野显微镜的分辨力比普通光镜大,利用这种显微镜能见到小至 4~200nm 的微粒,分辨率可比普通显微镜高 50 倍。暗视野显微镜常用来观察未染色的透明样品,如未染色的螺旋体的形态和运动。其使用方法如下:

1. 将显微镜上的明视野聚光器取下,将暗视野聚光镜安装好,调节到合适位置。
2. 在聚光镜上滴加香柏油一滴,放置标本于载物台上,调节聚光器的高度,使载玻片与聚光镜上的香柏油接触。
3. 在低倍镜下找聚光镜的光亮点或环状圈,调节聚光器上的调节螺杆,使光线聚中。转用高倍镜观察,最后用油镜观察。

(四) 荧光显微镜的使用

荧光显微镜(fluorescence microscope)与普通光镜的主要区别在于光源和滤色系统等的不同。荧光显微镜一般采用超高压汞灯为光源,经滤色系统将杂光吸收掉,仅使一定波长的激发光透射到标本上,标本中的荧光物质被激发光照射后发射出可见荧光,使得标本在荧光镜下清晰可辨。荧光显微镜的分辨力比普通光镜大,敏感性高,主要应用于细胞结构与功能及化学成分等的研究。其使用方法如下:

1. 打开灯源,预热 3~5 分钟(超高压汞灯要等待 3 分钟后才能达到最大亮度)。
2. 根据所观察的标本选择合适的滤色系统。
3. 放置标本,调整光源亮区中心于视野中央,用低倍镜调焦观察,然后根据需要转换高倍镜、油镜观察。

【注意事项】

1. 在使用显微镜前,要试着轻轻转动所有的调节旋钮,任何旋钮转动有困难时,绝不能用力过大,而要查明原因,排除障碍。如果自己不能解决时,要向指导教师说明,帮助解决。
2. 不要随意取下目镜,也不要任意拆卸各种零件,以防损坏。
3. 保持显微镜的清洁,机械部分用布擦拭,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,擦拭透镜时,要先将擦镜纸折叠为几折(不少于 4 折),从一个方向轻轻绕着物镜或目镜的轴旋转地擦拭镜头,每擦一次,擦镜纸就要折叠一次。
4. 在利用显微镜观察标本时,要养成两眼同睁、双手并用的习惯,以左眼观察视野,右眼用以绘图。
5. 切勿放反玻片标本。放反标本时,虽不影响低倍镜观察,但转换高倍镜和油镜时不但不能找到标本的物像,反而极易损坏玻片标本和物镜头。
6. 眼睛注视目镜观察标本时,禁止用粗准焦螺旋上升载物台,以防物镜头与玻片标本相碰损坏。

7. 用高倍镜和油镜时,只能用细准焦螺旋调焦,如果不能找到或看不清标本物像,原因可能有:①玻片标本放反了;②用前一个物镜观察时,物像未移到视野的中心;③物镜头太脏。

8. 使用荧光显微镜的时候,需注意以下事项:目镜上需安装保护镜或荧光遮光板,否则部分紫外线能直接通过目镜而伤害眼睛,在未装时不要用眼观察,以免引起眼部损伤;高压汞灯关闭后不能马上重开,须等待 30 分钟后方可再次启动,否则会影响汞灯寿命。

【作业与思考】

1. 使用显微镜时,标本移动的方向与视野中物像移动的方向有何不同?
2. 为什么显微镜的使用要按照从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序?
3. 使用高倍镜和油镜调焦时要注意哪些问题?

实验二 细胞基本形态与结构的观察

【实验目的】

1. 掌握临时制片的方法,了解永久制片的方法。
2. 掌握显微测量的方法。
3. 熟悉动植物细胞形态特点。
4. 初步掌握显微镜下生物绘图的基本方法和要求。

【实验用品】

1. 材料 洋葱鳞茎、人口腔上皮细胞、活蟾蜍。
2. 器材和仪器 普通光学显微镜、冰箱、红外灯、目镜测微尺、镜台测微尺、擦镜纸、载玻片、盖玻片、剪刀、镊子、解剖针、大头针、表面皿、乳头滴管、滤纸、牙签、纱布等。
3. 试剂 1% 碘液、1% 甲基蓝染液、Ringer 液、生理盐水、95% 酒精、无水酒精、二甲苯、冰醋酸、加拿大树胶。

【实验原理】

细胞是生物体结构和功能的基本单位。细胞的形态是与其功能相适应的,不同功能的细胞具有各种不同的形态特点,在分化程度较高的细胞更为明显,例如:具有收缩功能的肌细胞伸展为细长的梭形;具有感受刺激和传导神经电冲动功能的神经细胞具有长短不一的树突和轴突;运输氧和 CO_2 的红细胞为双凹圆盘状;可吞噬和消灭外源病原微生物的巨噬细胞具有发达的不规则形状的伪足,以利于其捕获细菌等异物。无论细胞的形状如何,对人体及动物细胞来说,其基本结构是一致的,一般可分为三大部分:细胞膜、细胞质和细胞核。

细胞的大小是细胞的重要特征之一,细胞的大小通常可用显微测微尺加以测量。测微尺分目镜测微尺和镜台测微尺,两尺要配合使用。镜台测微尺是置于载物台上的、位于一块载玻片中央用树胶封固的一圆形测微尺,长 1~2mm,分成 100 格或 200 格,每格实际长度为 0.01mm(10 μm) (图 2-1)。目镜测微尺是一块可配装在显微镜目镜中的刻有尺度的圆形玻璃片,玻璃片中心的尺度长 5~10mm,分成 50~100 格 (图 2-1)。由于不同目镜、物镜组合的放大倍数不相同,目镜测微尺每格实际代表的长度也不一样,因此用目镜测微尺测量细胞大小时必须先用镜台测微尺校正,以求出在一定放大倍数下,目

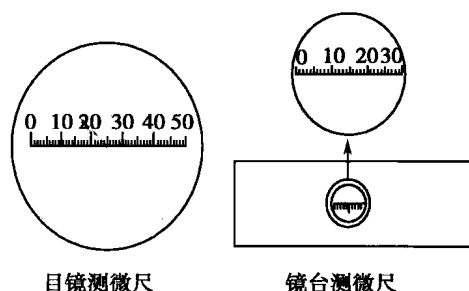


图 2-1 目镜测微尺和镜台测微尺

镜测微尺每小格所代表的相对长度。

细胞的体积差别较大,对于大多数人体及动物细胞来说,其直径一般在 $10\sim 20\mu\text{m}$,必须借助光镜才能被观察到。然而,一般的生物材料是不能直接置于光镜下直接观察的,也无法看清其内部结构。自然状态下的生物体器官组织由于过大或过厚造成光线不能透过,而且一些微细结构的折光率差别很小,即使光线能够透过也看不清楚。因此要观察某种细胞时,就必须运用显微技术中各种方法将其制成玻片标本才能观察。

将生物材料制成适于在光镜下观察的薄片即显微制片。新鲜的生物材料可用简单的方法做成临时制片即可观察,但为了保存以备以后的观察,常需按一定步骤制成永久制片。

为了达到观察的最佳目的,显微制片要满足以下条件:首先要尽量保持生物材料的天然状态,因此取材后需快速将生物材料做固定处理;制片必须薄而透明光线才可透入,需将材料尽量切成薄片或通过轻压、涂抹或其他手段使之分散外,还需采用其他方法使其透明;为了更好地观察到结构的细节,通常还要进行染色处理;需长期保存的制片,还应进行脱水和封固。

显微制片法根据制作方法大致可分为切片法和非切片法两大类。

切片法常用的是石蜡切片法、棉胶切片法和冷冻切片法。最常用的是石蜡切片法,其基本过程为把生物材料用石蜡包埋,以石蜡为支持物,把浸在蜡块中的生物材料切成理想的薄片,石蜡切片法通用于一般生物材料;棉胶切片法,把生物材料经棉胶包埋后切片,适用于特别坚硬的材料或特别柔软而体积大的材料;冷冻切片法,将生物材料在一定的介质中冷冻固化后切片,适用于研究活体标本或作组织化学的研究。以上各种切片法的基本步骤大致相同,皆通过透入不同的包埋剂,将浸入其中的动植物材料切成厚 $10\mu\text{m}$ 左右的薄片。以石蜡切片法为例简单介绍切片法的主要步骤。石蜡切片法包括固定、包埋、切片、染色、脱水和封固等步骤。主要操作过程为:固定→水洗→从低浓度逐级到高浓度酒精脱水→二甲苯透明→透蜡→包埋→切片→贴片→二甲苯脱蜡→逐级从高浓度到低浓度酒精处理,最后过渡到水→染色→逐级从低浓度到高浓度酒精脱水→二甲苯透明→加拿大树胶封固。

非切片法包括装片法、压片法和涂片法等。①装片法:装片法是将生物材料采取整体封固制成玻片标本的方法,用此法可制成临时或永久装片。常用于制作植物的叶表皮、微小生物如衣藻、变形虫、水螅等标本。②压片法:压片法是将天然的、易于分散的组织或经过处理后易于分散的组织置于载玻片和盖玻片之间,施加一定压力,将组织细胞压散的一种制片方法。常用于观察动物的肝脏、脊髓组织,果蝇幼虫的唾液腺,植物根尖等组织。③涂片法:把易于分散的生物标本均匀涂布在载玻片上的制片方法。涂片材料有单细胞生物、血液、细菌培养液、动植物的疏松组织、精巢、花药等。

非切片法因其操作简便,耗时间短,较容易开展。其制片的一般步骤是:①取材;②将材料置于载玻片上;③固定;④染色。因材料的来源、性质和制片的目的不同,各种制片的四个步骤方法、顺序、材料等不尽相同,并且有的制片可省略固定或染色的步骤。非切片法常用来制作临时制片,如需长期保存,也需要经过固定、染色、脱水、透明和封固各个步骤。

【实验内容与方法】

(一) 洋葱内表皮细胞临时装片的制备与观察

1. 用洁净的纱布把载玻片和盖玻片擦拭干净。
2. 在载玻片的中央滴一滴 1% 碘液。
3. 用镊子从洋葱鳞片叶内侧撕取一小块透明薄膜,用剪刀剪成约小指指甲大小,用镊子将其浸入载玻片的 1% 碘液中,用镊子把它展平。
4. 1% 碘液染色 1 分钟后,用镊子夹起盖玻片,使它的一边先接触载玻片上的染液,再缓缓放下,这样可尽量避免盖玻片下面出现气泡而影响观察,然后用吸水纸吸去盖玻片周围多余的碘液。

5. 将制备好的装片标本置显微镜下观察。先用低倍镜观察,可见视野中许多被染成浅黄色的长多边形细胞彼此相连,选择一个染色均匀、无气泡的区域移至视野中央再转高倍镜观察,在高倍镜下可见细胞最外面为一层棕黄色较厚的细胞壁,细胞壁以内是着色较浅的细胞质,细胞质的中央或一侧有一个染成棕黄色的椭圆形的细胞核,洋葱鳞叶内表皮细胞的质膜为一无色透明的薄层,在光镜下不易分辨(图 2-2)。

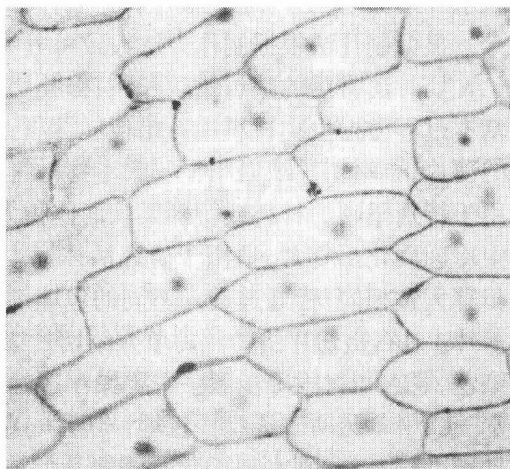


图 2-2 洋葱内表皮细胞 $\times 100$ 碘液染色

(二) 人口腔上皮细胞的临时装片的制备与观察

1. 用洁净的纱布把载玻片和盖玻片擦拭干净。
2. 在载玻片的中央滴一滴 1% 甲基蓝染液。
3. 清水漱净口腔,用消毒牙签(较粗的一端)在自己口腔面颊部的内侧壁上轻轻地刮几下。
4. 取出牙签,将较粗的一端置于载玻片上的染液中轻轻搅拌。

5. 1% 甲基蓝染色 1 分钟后,盖上盖玻片,然后用吸水纸吸去盖玻片周围多余的甲基蓝染液。

6. 将制备好的装片标本置显微镜下观察。先用低倍镜观察,可见在视野中有许多被染成浅蓝色的小片,成群或分散分布,挑选着色均匀、无气泡、比较分散的区域转到高倍镜观察,在高倍镜下,可见口腔黏膜上皮细胞呈扁平不规则的多边形,其表面有一层很薄的细胞膜,但在光镜下难以与浅蓝色的细胞质区分,细胞中央是染成深蓝色的细胞核,有时在核中可见深染的核仁(图 2-3)。

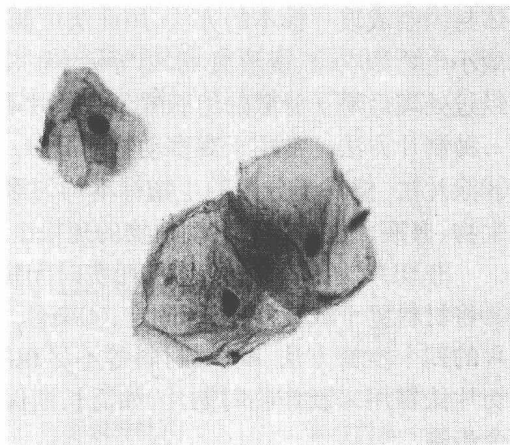


图 2-3 人口腔黏膜上皮细胞 $\times 400$ 甲基蓝染色