

Modern biological technology

现代 生物学技术

(第二版)

张丰德 王秀玲 主编



南开大学出版社

现代生物技术

Modern biological technology

(第二版)

主编 张丰德 王秀玲

编委 (以姓氏笔划为序)

王秀玲	王桂芬	刘桂琴	吕宪禹
宋玖雪	侯文强	张丰德	岳慧琴
郭世宜	崔同昌	樊廷玉	

南开大学出版社

天津

内 容 简 介

本书详细介绍了研究用显微镜技术、电子显微术、超显微结构制样技术、超速离心技术、紫外-可见分光光度法、红外分光光度法、荧光分光光度法、原子吸收光谱分析技术、扫描显微分光光度法、气相色谱技术、高效液相色谱分离分析技术、薄层色谱扫描、PCR 技术、交变脉冲电场凝胶电泳、蛋白质组研究技术、色谱工作站和影像系统等现代生物学技术的基本原理和实验方法。可作为大专院校生物系及有关专业本科生及研究生教材,也可供有关的科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

现代生物学技术/张丰德主编. —2 版. —天津:南开大学出版社,2001.1
ISBN 7-310-00870-7

I. 现… II. 张… III. 生物技术 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 73062 号

出版发行 南开大学出版社

地址:天津市南开区卫津路 94 号

邮编:300071 电话:(022)23508542

出版人 肖占鹏

承 印 天津宝坻第四印刷厂印刷

经 销 全国各地新华书店

版 次 2001 年 3 月第 2 版

印 次 2001 年 3 月第 2 次印刷

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 26.75

字 数 684 千字

印 数 1501 — 4500

定 价 37.00 元

第二版序言

“现代生物学技术”是南开大学生命科学学院及全国多所院校生物学系开设的高年级本科生和研究生课程,开设此课的目的是为了让学生了解和掌握进行生物学研究所涉及的现代化仪器设备的使用及操作方法,并在今后的工作中加以运用。

生命科学是实验性很强的科学,其每一点成就都建立在大量实验数据的基础之上,因此要求学生具有较强的动手能力。南开大学生命科学学院自 20 世纪 80 年代初开设此课以来,历经 20 年的教学科研实践,形成了一整套教学科研体系,培养了一大批掌握现代生物学技术的学生投身工作岗位,为其掌握和理解课程内容,培养较高的科学素养奠定了基础;使其在工作岗位上得心应手。

近几年来,生命科学研究突飞猛进,生物学技术也有了长足的进步,第一版的个别章节显得过时,其内容也不能反映最新的生物学技术,再加上第一版中存在一些错误,因此作者决定对其修订,并得到了南开大学教材基金的资助。

本版除对某些纰漏进行修改外,各章均未作大的更改,只作了小范围的变动。原第十三章改为 PCR 技术,其中加入了后基因组时代对功能基因组的一些研究方法。将等电聚焦凝胶电泳内容并入了一个新的重要研究领域——蛋白质组的研究技术中,列为第十五章。此外,根据近年来色谱仪的发展和影像分析系统的广泛应用,增补了第十六章,扼要地介绍了色谱工作站和 VDS 影像摄像分析子系统,以拓宽本书的应用范围。

根据现行的国家标准,第一版中的“分子量”“原子量”等词均已废止,改称“相对分子质量”“相对原子质量”,其单位也已废止,其值的大小用 10^a 表示。

由于作者水平有限,错漏之处在所难免。对所出现的错误,敬请广大读者批评指正。

编者

2000 年 10 月 31 日

目 录

第一章 研究用显微镜技术	(1)
§ 1.1 研究用显微镜的结构原理	(1)
§ 1.2 研究用显微镜的光学系统	(2)
1.2.1 显微镜的基本光学参数	(2)
1.2.2 光学透镜的象差	(3)
1.2.3 显微镜的光学系统	(4)
§ 1.3 研究用显微镜的种类	(6)
1.3.1 明视场显微镜	(6)
1.3.2 暗视场显微镜	(6)
1.3.3 相差显微镜	(7)
1.3.4 微分干涉差显微镜	(8)
1.3.5 偏光显微镜.....	(10)
1.3.6 荧光显微镜.....	(11)
§ 1.4 实验.....	(12)
1.4.1 明视场显微镜的观察方法.....	(12)
1.4.2 相差显微镜的观察方法.....	(13)
1.4.3 荧光显微镜的观察方法.....	(14)
1.4.4 DNA 的光学显微镜结构观察	(14)
1.4.5 淀粉粒的偏光显微镜观察.....	(15)
1.4.6 显微摄影技术.....	(16)
1.4.7 显微照片的半自动定量分析.....	(17)
思考题	(17)
参考文献	(18)
第二章 电子显微术	(19)
§ 2.1 透射电子显微镜.....	(19)
2.1.1 分辨能力和放大倍数.....	(19)
2.1.2 电子束及其形成.....	(21)
2.1.3 磁透镜.....	(22)
2.1.4 图像的反差形成原理.....	(26)
2.1.5 透射电子显微镜的仪器结构.....	(27)
2.1.6 透射电子显微镜的使用操作.....	(30)
§ 2.2 扫描电子显微镜.....	(34)

2.2.1	电子与样品的相互作用	(34)
2.2.2	扫描电子显微镜的成像原理	(36)
2.2.3	扫描电子显微镜的仪器结构	(37)
2.2.4	扫描电子显微镜的使用操作	(38)
§ 2.3	X 射线微区分析	(39)
2.3.1	X 射线的产生及其特性	(40)
2.3.2	X 射线的检测	(41)
2.3.3	X 射线微区分析的工作方法	(45)
2.3.4	X 射线微区分析在生物学中的应用	(46)
§ 2.4	扫描隧道显微镜	(47)
2.4.1	工作原理	(47)
2.4.2	在生命科学中的应用	(47)
§ 2.5	电子显微术在生命科学中的应用实例	(49)
2.5.1	用透射电镜观察超薄切片	(49)
2.5.2	不使用超薄切片的电镜技术	(49)
2.5.3	扫描电镜的应用	(49)
	思考题	(50)
	参考文献	(50)
	附录	(50)
第三章	超显微结构制样技术	(52)
§ 3.1	超薄切片技术	(52)
3.1.1	取材	(53)
3.1.2	固定	(54)
3.1.3	漂洗与脱水	(59)
3.1.4	渗透、包埋与聚合	(60)
3.1.5	超薄切片	(63)
3.1.6	超薄切片的染色	(65)
§ 3.2	实验	(67)
3.2.1	Formvar 支持膜的制备	(67)
3.2.2	动物样品包埋块的制备	(68)
3.2.3	植物样品包埋块的制备	(69)
3.2.4	超薄切片	(71)
3.2.5	超薄切片的染色	(73)
3.2.6	半薄切片的染色	(75)
§ 3.3	负染色技术	(77)
3.3.1	常用的负染色液	(77)
3.3.2	染色方法	(78)
3.3.3	负染色应注意的问题	(78)
§ 3.4	分子生物学电镜制样技术	(80)
3.4.1	核酸大分子电镜制样技术	(80)

3.4.2	蛋白质大分子电镜制样技术	(85)
3.4.3	多糖大分子电镜制样技术	(86)
§ 3.5	电子显微镜细胞化学技术	(87)
3.5.1	基本原理	(87)
3.5.2	三磷酸腺苷酶(ATPase)	(88)
3.5.3	酸性磷酸酶(ACP)	(89)
3.5.4	碱性磷酸酶(ALP)	(90)
3.5.5	琥珀酸脱氢酶(SDH)	(91)
3.5.6	葡萄糖-6-磷酸酶	(93)
3.5.7	髓过氧化物酶	(94)
§ 3.6	电镜放射自显影技术	(95)
3.6.1	原理	(95)
3.6.2	材料与仪器设备	(97)
3.6.3	实验步骤	(97)
§ 3.7	冷冻复型技术	(101)
3.7.1	原理	(101)
3.7.2	仪器设备及药品	(102)
3.7.3	实验步骤	(103)
3.7.4	冷冻蚀刻复型图像的辨认	(106)
§ 3.8	免疫电镜胶体金标记法	(107)
3.8.1	基本原理	(107)
3.8.2	实验程序	(108)
3.8.3	电镜水平的免疫染色	(111)
✓ § 3.9	核酸分子杂交技术	(115)
3.9.1	基本原理	(115)
3.9.2	试剂和器具	(116)
3.9.3	rDNA 探针的制备和标记	(116)
3.9.4	原位杂交及杂交子的检测	(118)
§ 3.10	扫描电镜样品制备技术	(119)
3.10.1	基本原理	(119)
3.10.2	扫描电镜的活体样品制备	(120)
3.10.3	孢子、花粉等少水样品的制备	(121)
3.10.4	扫描电镜一般生物样品制备方法——ODO-导电染色法	(121)
	思考题	(123)
	参考文献	(123)
	附录 1 仪器操作步骤	(124)
	附录 2 缓冲液	(125)
	附录 3 固定液	(127)
	附录 4 其它	(129)

第四章 超离心技术	(130)
§ 4.1 基本原理	(130)
4.1.1 离心力	(130)
4.1.2 沉降系数	(131)
4.1.3 沉降时间	(133)
4.1.4 沉降速度	(134)
§ 4.2 离心机的种类和基本结构	(134)
4.2.1 高速离心机	(134)
4.2.2 制备性超速离心机	(135)
4.2.3 分析性超速离心机	(136)
§ 4.3 超离心法	(137)
4.3.1 差速离心法	(137)
4.3.2 密度梯度离心法	(137)
4.3.3 等密度梯度离心法	(139)
4.3.4 密度梯度的制备和收集	(139)
§ 4.4 超速离心在生物学中的应用	(142)
4.4.1 分子量的测定	(142)
4.4.2 未知 DNA 样品密度的测定	(142)
4.4.3 从密度推算 DNA 的 G-C 碱基含量	(143)
4.4.4 检测生物大分子中构象的变化	(143)
§ 4.5 实验	(144)
4.5.1 大鼠肝线粒体的分离	(144)
4.5.2 大鼠肝细胞核的分离	(145)
4.5.3 氯化钠密度梯度纯化质粒 DNA	(146)
4.5.4 氯化铯等密度梯度超离心纯化质粒 DNA	(147)
思考题	(150)
参考文献	(151)
附录 1 离心机的操作规程	(151)
附录 2 DGF-U 型密度梯度形成仪操作规程	(153)
附录 3 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算	(153)
第五章 紫外-可见分光光度法	(155)
§ 5.1 基本知识	(155)
5.1.1 紫外-可见光吸收光谱的本质	(155)
5.1.2 Lambert-Beer 定律	(156)
5.1.3 吸收定律的正确应用	(157)
§ 5.2 分光光度计的一般结构	(160)
§ 5.3 紫外-可见分光光度计的特殊装置	(162)
5.3.1 扫描装置的设计原理	(162)
5.3.2 斩波器	(163)
5.3.3 双光束分光光度计的光路设计	(163)

5.3.4	双波长分光光度计的光路设计	(163)
§ 5.4	分光光度法	(164)
5.4.1	定性分析	(164)
5.4.2	定量分析	(165)
§ 5.5	生物大分子的光学特性	(167)
5.5.1	蛋白质的光学特性	(167)
5.5.2	核酸的光学特性	(168)
§ 5.6	实验	(168)
5.6.1	单色器的分光效应	(168)
5.6.2	高锰酸钾的可见光谱	(169)
5.6.3	蛋白质和 DNA 的紫外吸收光谱	(170)
5.6.4	蛋白质的微分光谱	(170)
5.6.5	苹果酸脱氢酶(MDH)的测定	(172)
5.6.6	不同组织苹果酸脱氢酶 k_m 值的测定	(173)
5.6.7	心肌、骨骼肌线粒体内膜 ATPase 的测定	(174)
5.6.8	DNA 的 T_m 值测定	(174)
5.6.9	DNA 中 A-T 碱基含量的紫外分析法	(175)
5.6.10	烟酸的光谱测定	(176)
5.6.11	豆类球蛋白的定量分析	(178)
5.6.12	豆类醇溶蛋白的定量分析	(179)
5.6.13	维生素 D 的测定	(180)
5.6.14	豆类种子 β -胡萝卜素的测定	(182)
	思考题	(184)
	参考文献	(184)
第六章	红外分光光度法	(185)
§ 6.1	基本知识	(185)
6.1.1	分子的主要振动类型——伸展振动和弯曲振动	(185)
6.1.2	吸收带的位置和强度	(186)
6.1.3	吸收峰的表示方法	(187)
6.1.4	几种常用术语	(187)
§ 6.2	基本结构	(187)
6.2.1	干涉仪原理	(188)
6.2.2	付里叶转换	(189)
§ 6.3	红外光谱分析的试样制备方法	(190)
§ 6.4	实验	(191)
6.4.1	试样制备技术	(191)
6.4.2	蛋白质的红外光谱分析	(192)
6.4.3	多糖分子的红外光谱分析	(193)
6.4.4	脂溶性维生素的红外光谱分析	(194)
6.4.5	毛纤维的红外光谱分析	(194)

6.4.6 红外光谱法在基因探测中的应用	(195)
思考题	(196)
参考文献	(196)
附录 5DX 付里叶转换红外分光光度计	(197)
第七章 荧光分光光度法	(201)
§ 7.1 荧光分析的基本知识	(201)
7.1.1 荧光的产生	(201)
7.1.2 荧光量子产率	(201)
7.1.3 荧光强度	(202)
7.1.4 荧光偏振	(202)
7.1.5 相对荧光量子效率	(202)
§ 7.2 荧光分光光度计的基本结构	(204)
§ 7.3 荧光分析的影响因素及注意事项	(204)
7.3.1 温度对荧光的影响	(204)
7.3.2 pH 的影响	(204)
7.3.3 溶剂的影响	(204)
7.3.4 荧光的消退	(204)
7.3.5 防止污染	(204)
§ 7.4 生物样品的荧光分析	(204)
7.4.1 维生素 B ₁ 的测定	(206)
7.4.2 维生素 B ₂ 的测定	(208)
7.4.3 维生素 C 的测定	(209)
7.4.4 维生素 E 的测定	(211)
7.4.5 微量元素硒的测定	(213)
7.4.6 蛋白质的测定	(215)
7.4.7 肌肉中乳酸脱氢酶的测定	(216)
7.4.8 毫微克 DNA 的测定	(217)
7.4.9 单个细胞核 DNA 的测定	(218)
7.4.10 线粒体质膜流动性的测定	(218)
思考题	(219)
参考文献	(220)
附录 RF-540 荧光分光光度计的性能和操作方法	(220)
第八章 原子吸收光谱分析技术	(221)
§ 8.1 基本原理	(221)
8.1.1 原子吸收光谱的产生	(221)
8.1.2 原子谱线的轮廓与变宽	(222)
8.1.3 吸收定律	(224)
§ 8.2 仪器结构	(225)
8.2.1 光源	(226)
8.2.2 原子化器	(226)

8.2.3 单色器	(227)
8.2.4 检测器和读出系统	(227)
§ 8.3 分析方法	(228)
8.3.1 原子吸收光谱分析中的干扰及其消除	(228)
8.3.2 分析方法	(230)
8.3.3 灵敏度和检出限	(232)
§ 8.4 实验	(233)
8.4.1 苹果中钙含量的测定	(233)
8.4.2 血清中镁含量的测定	(234)
8.4.3 头发中铅含量的测定	(235)
8.4.4 食用豆中微量元素铁、锰、锌含量的测定	(236)
8.4.5 食用豆中微量元素铜、镍含量的测定	(237)
思考题	(238)
参考文献	(239)
附录 1 塞曼原子吸收法的主要吸收线和原子吸收相对灵敏度	(239)
附录 2 日立 180-80 型偏振塞曼原子吸收分光光度计操作规程	(241)
第九章 扫描显微分光光度法	(246)
§ 9.1 显微分光光度法测定原理	(246)
§ 9.2 显微光度计扫描测定的基本原理	(247)
§ 9.3 扫描显微分光光度计的基本结构	(247)
9.3.1 显微镜	(248)
9.3.2 光度计	(248)
9.3.3 扫描系统	(249)
9.3.4 自动控制系统	(249)
§ 9.4 显微光度法的应用实例	(250)
9.4.1 细胞容积的测定	(250)
9.4.2 剧烈运动前后细胞内酶的显微定量分析	(251)
9.4.3 染色体的核型分析	(253)
9.4.4 人染色体脆性位点的测定	(254)
9.4.5 染色体带纹的定量分析	(256)
9.4.6 核 DNA 的显微荧光定量分析	(261)
9.4.7 鱼三倍体 DNA 孚尔根测定方法	(262)
9.4.8 染色体 DNA 的显微荧光定量分析	(263)
9.4.9 毛纤维的荧光测定	(264)
思考题	(264)
参考文献	(265)
附录 Univar 扫描显微分光光度计的性能及操作方法	(265)
第十章 气相色谱技术	(267)
§ 10.1 基本原理	(267)
10.1.1 概述	(267)

10.1.2 气相色谱的分析过程	(268)
§ 10.2 气相色谱仪的基本结构	(269)
10.2.1 气相色谱填充柱	(269)
10.2.2 毛细管色谱柱	(271)
10.2.3 检测器	(272)
§ 10.3 气相色谱分析方法	(274)
10.3.1 操作条件的选择	(274)
10.3.2 定性和定量方法	(275)
§ 10.4 实验	(277)
10.4.1 食用豆类脂肪酸的气相色谱分离和测定	(277)
10.4.2 植物激素脱落酸的毛细管色谱分离和测定	(279)
10.4.3 微生物胞外多糖的毛细管色谱分离和测定	(281)
10.4.4 玉米螟昆虫激素的气相色谱分离和测定	(282)
10.4.5 酒精发酵液中乙醇含量的气相色谱分析	(283)
10.4.6 食用豆类碘的测定	(284)
10.4.7 丁醇的气相色谱分析	(286)
10.4.8 植物材料释放乙烯的气相色谱分离和测定	(288)
思考题	(289)
参考文献	(289)
附录 1 岛津 GC-7A 气相色谱仪的操作方法	(289)
附录 2 实验室常用固定液	(293)
附录 3 不同温度下水的饱和蒸气压	(294)
附录 4 不同进出口压力时的压力校正值 j	(294)
附录 5 标准筛的规格	(295)
第十一章 高效液相色谱分离分析技术	(296)
§ 11.1 概述	(296)
§ 11.2 HPLC 的类型及其分离的基本原理	(296)
11.2.1 液-固色谱	(296)
11.2.2 液-液色谱和键合相色谱	(297)
11.2.3 离子交换色谱	(298)
11.2.4 排斥色谱(凝胶色谱)	(298)
§ 11.3 高效液相色谱仪的结构	(299)
11.3.1 储液瓶	(299)
11.3.2 高压输液泵	(300)
11.3.3 进样系统	(300)
11.3.4 色谱柱	(301)
11.3.5 检测器	(301)
§ 11.4 实验	(302)
11.4.1 单核苷酸的分离分析	(302)
11.4.2 可溶性糖的定量分析	(303)

11.4.3 氨基酸的分离分析技术	(304)
思考题	(306)
参考文献	(307)
附录1 岛津 LC-4A 高效液相色谱仪的结构与操作	(307)
附录2 氨基酸分析的预处理技术	(310)
第十二章 薄层色谱扫描仪	(317)
§ 12.1 仪器结构原理	(317)
12.1.1 测定原理	(317)
12.1.2 仪器结构	(318)
§ 12.2 扫描方法	(321)
§ 12.3 实验	(322)
12.3.1 线性扫描操作技术	(322)
12.3.2 锯齿扫描操作技术	(322)
12.3.3 微量核酸样品的定量分析	(323)
12.3.4 同功酶——多酚氧化酶的定量分析	(323)
思考题	(324)
参考文献	(325)
附录1 CS-910 双波长薄层色谱扫描仪的性能与操作	(325)
附录2 C-RIB 的定量分析方法	(327)
第十三章 PCR 技术	(329)
§ 13.1 PCR 技术原理	(329)
§ 13.2 PCR 的引物设计和 DNA 聚合酶	(331)
13.2.1 引物设计	(331)
13.2.2 DNA 聚合酶	(331)
§ 13.3 PCR 扩增仪	(332)
13.3.1 加热与冷却系统	(332)
13.3.2 PCR 扩增仪的自动化	(332)
13.3.3 PCR 扩增仪示例——9700 型 PCR 扩增仪	(333)
§ 13.4 PCR 技术的应用及发展	(337)
13.4.1 双链 DNA 模板的 PCR 扩增	(337)
13.4.2 PCR 扩增 RNA	(338)
13.4.3 不对称 PCR	(339)
13.4.4 原位聚合酶链式反应	(340)
13.4.5 长片段 DNA 的 PCR 技术	(341)
13.4.6 基因表达系列分析	(342)
13.4.7 有序差异显示法	(343)
思考题	(345)
参考文献	(345)
第十四章 交变脉冲电场凝胶电泳	(346)
§ 14.1 原理	(346)

§ 14.2	交变脉冲电泳装置的类型	(346)
14.2.1	正交交变电场凝胶电泳	(346)
14.2.2	钳形均匀电场电泳	(347)
14.2.3	旋转凝胶电泳	(348)
14.2.4	倒转电场凝胶电泳	(348)
§ 14.3	影响 PFGE 分离的因素	(348)
14.3.1	脉冲时间的影响	(348)
14.3.2	分子大小、电场强度和温度的影响	(348)
14.3.3	电场间角度的影响	(349)
§ 14.4	分子陷阱	(349)
§ 14.5	分子泳动的机制	(350)
14.5.1	常规电泳的分子机制	(350)
14.5.2	FIGE 分离过程的分子机制	(350)
14.5.3	分子在 OFAGE 中的重新定向机制	(350)
14.5.4	巨大分子的泳动	(351)
§ 14.6	带宽和分辨率	(352)
§ 14.7	脉冲电泳方法	(352)
14.7.1	样品制备	(352)
14.7.2	DNA 的标准品	(352)
14.7.3	电泳方法	(353)
§ 14.8	应用实例	(353)
14.8.1	酵母染色体 OFAGE 的分离	(353)
14.8.2	棉病囊霉的电泳核型分析	(354)
14.8.3	小麦、大麦、黑麦大分子量 DNA 的脉冲电泳分离	(355)
14.8.4	水稻大分子 DNA 的脉冲电泳分离	(355)
	思考题	(356)
	参考文献	(356)
第十五章	蛋白质组的研究技术	(357)
§ 15.1	蛋白质组的分析流程	(357)
§ 15.2	双向凝胶电泳	(358)
15.2.1	基本原理	(358)
15.2.2	仪器结构	(361)
15.2.3	具体操作	(362)
§ 15.3	质谱技术	(377)
15.3.1	基本知识	(378)
15.3.2	仪器结构	(382)
15.3.3	应用实例	(383)
	思考题	(385)
	参考文献	(385)

第十六章 色谱工作站和影像系统.....	(386)
§ 16.1 数据处理机和色谱工作站.....	(386)
16.1.1 概述.....	(386)
16.1.2 积分仪和色谱工作站的定量计算方法.....	(388)
16.1.3 色谱工作站.....	(390)
§ 16.2 CCD 影像系统	(400)
16.2.1 影像系统的组成.....	(400)
16.2.2 VDS 影像分析摄录系统	(400)
16.2.3 图像定量分析原理.....	(402)
16.2.4 Image Master 软件功能	(404)
思考题.....	(408)
参考文献.....	(408)

第一章 研究用显微镜技术

显微镜的发明,距今虽有四百余年,但仍然是研究生命科学的重要工具。光学显微镜在这四百年中,不断改进创新,适应生命科学发展的需要,出现了各种功能的显微镜,是进行细胞生物学研究必须掌握的工具。

§ 1.1 研究用显微镜的结构原理

显微镜结构分光学、照明、机械三个系统。决定质量好坏的是光学系统,光学系统包括目镜、物镜和聚光器。样品通过物镜形成初生倒置实象,然后通过目镜在人的眼球视网膜上形成直立实象,此象通过目镜反向延长,在显微镜中一定距离处形成倒置虚象,虚象和视网膜上的实象完全重合,如图 1-1 所示。

在显微镜的结构中,几个常用术语含意如下:

(1)明视距离

从眼睛的水晶体到放大虚象之间的距离,即 250mm。

(2)机械筒长

镜筒管上缘到物镜螺旋肩基部的长度,一般为 160mm,如图 1-2 所示。

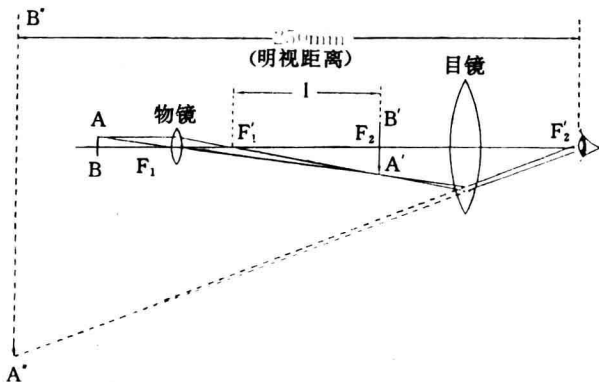


图 1-1 光学显微镜成像图

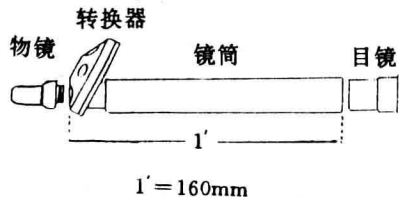


图 1-2 机械筒长

(3)光学筒长

由物镜的上焦平面到目镜的下焦平面之间的距离(图 1-1 中的 l)。其长度随机械筒长及物镜而不同,光学筒长略小于机械筒长。仪器上所注数字一般是指机械筒长。

§ 1.2 研究用显微镜的光学系统

1.2.1 显微镜的基本光学参数

1. 分辨力(Resolving Power)

分辨力也叫分辨本领或解象力,光学显微镜分辨力定义为在 250mm 明视距离处能分辨清楚尽可能靠近的两点的能力,辨认两点之间的距离愈小,则分辨本领愈高,人眼的分辨力约为 $100\mu\text{m}$,而显微镜的分辨力 R 则以下列公式计算:

$$R = 0.61\lambda / N. A.$$

式中, λ —— 所用的光线波长

$N. A.$ —— 数值孔径

从上述公式可以看到,决定显微镜的分辨力主要有两个因素,一是数值孔径,一是波长。数值孔径愈大,波长愈短,能分辨清两点距离愈小,显微镜的分辨力愈高。

数值孔径(Numerical Aperture, $N. A.$)也称镜口率,由两个参数组成,即:

$$N. A. = n \cdot \sin a$$

式中, n —— 物空间介质的折射率

a —— 物方孔径角

图 1-3 为数值孔径图解。

孔径角亦称镜口率,是从物方光轴上的物点发出的光线,与物镜前透镜有效直径的边缘所张开的角度, a 是轴上点光线在干燥系统的孔径角, b 是油浸系统的孔径角, a 和 b 值小于 90° , $\sin a$ 和 $\sin b$ 最大值不超过 1,油浸物镜由于 n 值变大, $N. A.$ 值也随之变大,目前最多可达 1.4。而照明波长最短为 400nm ,代入公式则 $R = 0.61 \times 0.4 / 1.4 = 0.17$,即光学显微镜最大分辨力约为 $0.2\mu\text{m}$,约等于可见光最短波长的一半。细胞内的结构如线粒体、中心体、核仁等在这种分辨力水平观察到的结构,称为显微结构。

2. 放大率(Magnification)

放大率也称放大倍数,是眼睛看到象的大小与对应标本大小的比值,放大倍数是指长度而不是指面积与体积。

$$\text{目镜放大倍数 } MF_{\text{目}} = \frac{250\text{mm}(\text{明视距离})}{f'_{\text{目}}(\text{目镜焦距})}$$

$$\text{物镜放大倍数 } MF_{\text{物}} = \frac{160\text{mm}(\text{光学筒长})}{f'_{\text{物}}(\text{物镜焦距})}$$

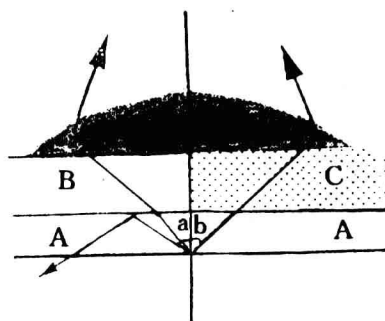


图 1-3 数值孔径图解

A 玻璃盖片; B—空气($n=1$);
C—油($n=1.5$); D—物镜