



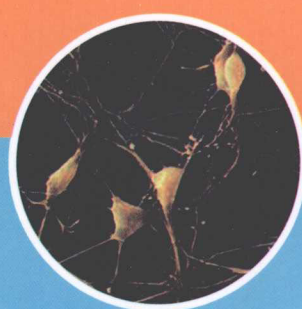
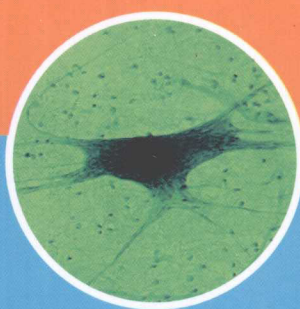
普通高等教育“十二五”规划教材
兼供医学微生物学实验课使用

医学细胞生物学 实验教程

(第二版)

Experiment Guide
in Medical Cell Biology
(Second Edition)

赵 刚 刘江东 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

兼供医学生物学实验课使用

医学细胞生物学实验教程

(第二版)

赵 刚 刘江东 主编

科学出版社

北 京

版权所有,侵权必究

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303

内 容 简 介

本书是医学细胞生物学的实验课教材,也可供医学生物学实验课使用。全书共编入了20个重要的细胞生物学实验项目,在内容的选择上,既有光学显微镜的使用、细胞形态结构观察等经典实验,又有细胞周期的流式检测、细胞凋亡的诱导与观察等反映学科发展水平的实验项目,并注意了与现代医学和传统中医药学的结合。另外,在附录中专门编入了16个与细胞生物学实验相关的有用资料。

本书适合高等医药院校各专业使用,也可供综合性院校、师范院校和农林院校相关专业的细胞生物学实验课教学使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验教程/赵刚,刘江东主编. —2版. —北京:科学出版社, 2012.10

普通高等教育“十二五”规划教材. 兼供医学生物学实验课使用

ISBN 978-7-03-035746-5

I. ①医… II. ①赵…②刘… III. ①人体细胞学—细胞生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①R329.2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第239574号

责任编辑:杨瑰玉/责任校对:王望容

责任印制:彭超/封面设计:苏波

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>

武汉市新华印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

开本:787×1092 1/16

2012年10月第 二 版 印张:13 1/4

2012年10月第一次印刷 字数:302 000

定价:26.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《医学细胞生物学实验教程》(第二版)

编 委 会

主 编 赵 刚 刘江东

副主编 王 倩 李 军 徐云丹

编 委 (按姓氏笔画排序)

王志宏 王明艳 王晓玲 王 倩

文礼湘 史海龙 刘江东 李 军

赵 刚 倪 娅 徐云丹 高碧珍

第二版前言

时光飞逝,本书的第一版出版至今已有4年了。回想起4年前的夏天,也就是2008年北京奥运会召开的时节,我基本放弃观看奥运电视转播,趁着暑假,冒着炎热,完成了本书第一版的主编工作。当第一版出版后,我就计划每3年修订再版一次,使本书得以不断完善。但后来发现,想完成这个计划也不是一件容易的事情,因为平时的教学、科研和其他方面的工作较为繁忙,想静下心来写作,却常常力不从心,所以本书修订再版的计划推到了今年。科学出版社武汉分公司的领导与编辑对我们这本教材一直给予了厚爱,为了促进第二版的编写工作,今年3月底协助我们在湖北中医药大学召开了全国高等中医药院校医学细胞生物学实验教学研讨会暨《医学细胞生物学实验教程(第二版)》的编写会议。本书的修订工作从今年4月正式启动,到了暑假后全力投入编写工作,直到2012年伦敦奥运会闭幕才基本完成任务,看来,这本教材与4年一度的奥运会有点缘分。

众所周知,细胞生物学是当代生命科学领域发展最快的学科之一,也是与医学关系最密切的学科之一。因为细胞是包括人体在内的生物体结构与功能的基本单位,所有疾病的发生都有其相应的细胞学基础,“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找答案”。细胞生物学是探索研究细胞结构、功能与生命活动规律的学科,其理论和技术已广泛渗透到了基础医学和临床医学的众多领域,揭示了众多疾病的发生机制和药物的作用机制,对医学的发展起到了很大的推动作用。因此,国内绝大部分医学院校包括高等中医药院校都先后为本科生开设了细胞生物学课程,细胞生物学已成为高等医学教育课程体系中不可缺少的重要内容。另一方面,细胞生物学是一门实验性很强的学科,实验研究是细胞生物学形成和发展的基础。因此,细胞生物学实验课是细胞生物学教学中不可缺少的一个重要方面。通过实验课,可以帮助医学生获得基本实验技能和研究方法的训练,加深对细胞生物学理论问题和细胞形态结构特点的认识,培养实事求是的科学态度、分析问题和解决问题的能力。

一本高质量的实验教科书是顺利完成细胞生物学实验课并达到教学目的的基本保证。编写出一本科学性、适用性、可读性兼备的,特色鲜明、图文并茂的细胞生物学实验教科书是我们的努力方向。目前国内已有数个版本的医学细胞生物学实验教材出版,但精品不多,这些教材包括本书的第一版,在内容的选择、科学性、实用性与可读性等方面存在许多不足,还不能很好地适应学科的发展和人才培养的需要,所以,细胞生物学实验教材需要不断地推陈出新。从另一角度来说,为学生们编写科学性和实用性较高的实验课教材是我们作为教师的基本职责。基于这个认识,我们8所院校的同行人共同编写了这本新版的细胞生物学实验教科书。

与第一版相比,第二版内容更新了60%以上,在科学性、适用性、可读性等方面都有显著改善,质量明显提高。本书的特点有以下几个方面:第一,注重科学性,注意介绍每项

实验所涉及的背景知识和基本原理,使学生能够较全面了解实验所涉及的理论问题。第二,注重实用性,在实验方法和操作步骤的叙述上力求详尽,包括实验试剂的配制方法等一些细节问题也给予了详细说明。另外,将基于普通数码相机的徒手显微摄影方法贯穿于相关实验项目,该方法是我们建立的一种简便快捷的显微摄影方法,能使学生及时记录显微镜下观察到的细胞形态结构。第三,注重可读性。在新版中,增加了很多插图,使实验原理、方法和结果的说明更加直观,朝着图文并茂的目标前进了一步。第四,提倡环保和善待动物。在书中贯穿了绿色实验、善待实验动物等科学实验的现代理念。第五,突出中医药院校特色,书中反映了细胞生物学实验技术在中医药研究中应用的信息。

全书共编入了 20 个重要的细胞生物学实验项目,在内容的选择上,既有光学显微镜的使用、细胞形态结构观察等经典实验,又有细胞周期的流式检测、细胞凋亡的诱导与观察等反映学科发展水平的实验项目,并注意了与现代医学和传统中医药学的结合。另外,在附录中专门编入了 16 个与细胞生物学实验相关的有用资料。鉴于各学校在课时和实验设施上存在较大差异,在使用本书时,可根据各自的条件选择实施书中的实验项目。

虽然我们做出了很多努力,但限于时间,限于水平,这本实验教材还没有完全达到我们期望的目标,可能还存在一些需要改进或完善的地方,恳请使用本书的老师们和同学们批评指正。

参加本书编写的教师有武汉大学的刘江东,上海中医药大学的王晓玲,南京中医药大学的王明艳,福建中医药大学的高碧珍,长春中医药大学的王志宏,湖南中医药大学的文礼湘,陕西中医学院的李军、史海龙,湖北中医药大学的赵刚、王倩、倪娅、徐云丹等。本书初稿的修改、全书的统稿以及全部插图的技术性处理由赵刚和刘江东完成。在本书编写过程中得到了科学出版社和各编委所在学校的大力支持,湖北中医药大学教务处、基础医学院和医学生物学教研室对本书的编写提供了很多的方便,在此一并表示衷心感谢!

今年是北京师范大学建校 110 周年,明年是武汉大学建校 120 周年,作为这两所大学的双重校友,我想将本书作为献给两所母校校庆的小小礼物。另外,由中国细胞生物学学会主办、湖北省细胞生物学学会和武汉大学承办的“中国细胞生物学学会 2013 年全国学术大会”将于 2013 年 4 月在武汉举行,也将本书献给明年召开的武汉细胞生物学大会。

赵 刚

2012 年 8 月 18 日于武昌

目 录

实验一 光学显微镜的使用方法与显微摄影技术	1
实验二 荧光显微镜和倒置显微镜的结构与使用	16
实验三 电子显微镜的使用及超薄切片技术	23
实验四 细胞形态结构与细胞器的观察	33
实验五 细胞骨架的显示与观察	47
实验六 细胞化学成分的显示与观察	54
实验七 细胞膜通透性检测与细胞吞噬活动观察	65
附:人红细胞膜 ABO 血型抗原检测	71
实验八 细胞核和线粒体的离心分离与检测	75
实验九 小鼠染色体的制备与观察	78
实验十 人染色体标本的制备	89
附:人类染色体核型分析	96
实验十一 人染色体 NOR 的银染显示与观察	101
实验十二 人染色体端粒的 FISH 法显示与观察	104
实验十三 细胞分裂过程的观察	110
实验十四 细胞的体外培养与观察	116
实验十五 细胞融合的诱导与观察	134
实验十六 细胞早熟凝集染色体的观察	139
实验十七 细胞周期的流式检测	145
实验十八 细胞凋亡的诱导与观察	152
实验十九 人基因组 DNA 的提取与电泳检测	157
实验二十 人 SRY 基因的 PCR 方法检测	169
参考文献	178
附录	179

实验一 光学显微镜的使用方法与显微摄影技术

【目的要求】

- (1) 熟悉普通光学显微镜的构造、性能和工作原理。
- (2) 掌握光镜的基本操作以及三种物镜(低倍镜、高倍镜和油镜)的使用方法。
- (3) 初步掌握徒手数码显微摄影技术。
- (4) 了解光学显微镜的维护方法。

【实验原理】

光学显微镜(light microscope)简称显微镜或光镜,是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的发明和使用已有 400 多年的历史。1590 年前后,荷兰的汉斯(Hans)父子创制了放大倍数仅为 10 倍的原始显微镜。1665 年英国物理学家虎克(Hooke)研制出性能更好的显微镜并利用该显微镜发现了机体的基本构成单位——细胞。400 多年来,随着技术的进步,经过细胞学家和生产厂商的不断改进,光学显微镜的结构和性能逐步完善,形成了品种繁多、型号各异的现代光学显微镜系列(图 1-1)。除了广泛使用的普通光镜外,还有相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜(图 1-2)和倒置显微镜(图 1-3)等特殊功能或用途的光镜。

不同品牌的光学显微镜虽然在外形上差异较大,但其基本的构造和工作原理是相似的。一台普通光镜主要由机械系统和光学系统两部分构成,而作为显微镜核心部分的光学系统则主要包括物镜、目镜、聚光镜和光源等部件。



图 1-1 光学显微镜的外观与型号举例

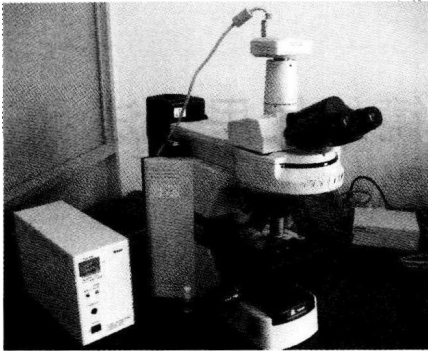


图 1-2 荧光显微镜(Nikon 80i 型)



图 1-3 倒置显微镜(Olympus CK40 型)

那么,光镜是如何使微小物体放大的呢?换句话说,一台光镜成像的基本原理是怎样的呢?实际上,光镜是利用透镜成像的原理使微小的物体形成放大影像的。光镜上的物镜、目镜和聚光镜的结构虽然比较复杂,但它们的作用都各自相当于一个凸透镜(正透镜),被检标本放在物镜下方的 1~2 倍焦距之间,来自聚光器的光线照射标本后进入物镜,物镜使标本放大后在镜筒中(物镜的上方)形成一个倒置的放大实像,目镜再将倒置的实像进一步放大为倒置的虚像;依靠调焦装置可使该虚像落在人眼的明视距离处(25 cm),最后在眼球的视网膜上形成正置的实像。显微镜中被放大的倒立虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的,该虚像看起来好像在离眼睛 25 cm 处(图 1-4)。

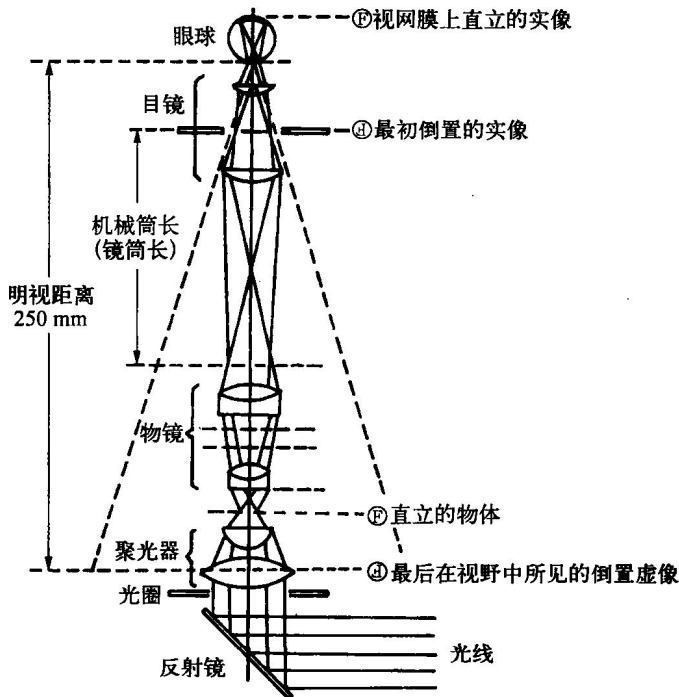


图 1-4 光学显微镜的放大原理及光路图

一台显微镜的性能和质量的高低可由其各种参数来反映,包括分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等性能指标。这些能力都有一定限度,彼此既相互作用又相互制约,改善或提高某方面的性能,往往会使另一性能降低。

分辨率(resolving power)是光镜的最重要性能指标。所谓分辨率也称分辨本领,是指显微镜或人眼在 25 cm 的明视距离处,能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力,即分辨出标本上相互接近的两点间的最小距离的能力。据测定,人眼的分辨率约为 0.2 mm(200 μm),而光镜的分辨率可达 0.2 μm 。显微镜的分辨率由物镜的分辨率决定,物镜的分辨率就是显微镜的分辨率,而目镜与显微镜的分辨率无关,它只将物镜已分辨的影像进行第二次放大。光镜的分辨率(R)可以下式计算:

$$R = \frac{0.61\lambda}{NA} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin\alpha/2}$$

λ 为照明光线的波长,白光约为 0.5 μm , $\sin\alpha/2$ 的最大值为 1, n 最大为 1.5。将这些数值代入公式,得到光镜的最大分辨率为 $R = 0.61 \times 0.5 \mu\text{m} / 1.5 = 0.2 \mu\text{m}$ 。

NA 为数值孔径(meridional aperture),也称镜口率,是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数。 NA 等于物镜和被检样品之间的介质的折射率(n)与物镜所接受光锥的顶角(α ,即镜口角)一半的正弦值的乘积。用公式表示为 $NA = n \cdot \sin\alpha/2$ 。

镜口角 α 指位于物镜光轴上标本的一个点发出的光线延伸到物镜前透镜的有效直径的两端所形成的夹角(即标本对物镜镜口张角的半角)。物镜与标本之间介质的折射率,空气为 1,水为 1.33,油为 1.5 左右。

从 NA 的公式可以得知,镜口角越大,进入物镜的光线越多;介质的折射率越大,则数值孔径越大。一般来说,干燥物镜(以空气为介质)的 NA 值为 0.05~0.95;水浸物镜为 0.1~1.20;油浸物镜(油镜)为 0.83~1.40。

物镜的 NA 决定一台显微镜的主要光学性能, NA 与分辨率成正比, NA 越大,显微镜的分辨能力越强,但 NA 与焦点深度(显微镜对标本某一点或平面准焦时,焦点平面上下影像清晰的范围)成反比。各种物镜的数值孔径数值一般标刻在其外壳上。

放大率或放大倍数是光镜性能的另一重要参数,一台显微镜的总放大倍数等于目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积。常用显微镜的最大放大倍数一般为 1600 倍(16 \times 100)。

光学显微镜是生物科学和医学研究领域常用的仪器,它在细胞生物学、遗传学、组织学、病理学、微生物学以及药用植物学、中药鉴定学等相关学科的教学科研工作中有着极为广泛的用途,是研究人体及其他生物机体组织和细胞结构的强有力工具。

【器材与试剂】

1. 器材

普通双目光学显微镜,普通数码相机(或带照相装置的手机),擦镜纸,卫生纸。

2. 材料

鸡血涂片(商品片),人血涂片(商品片),羊毛交叉装片,英文字母装片。

3. 试剂

液体石蜡(石蜡油)或其他镜油、镜头清洁剂(7份乙醚+3份无水乙醇)或无水乙醇。

【内容与方法】

一、光学显微镜的基本构造及性能

(一) 机械部分

1. 镜筒

镜筒(tube)为安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构(图1-5和图1-6),其上

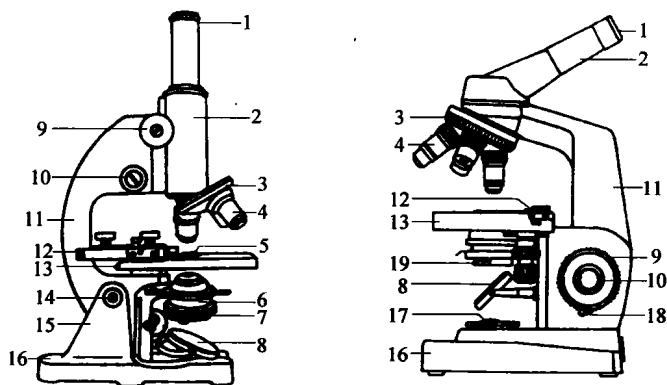


图1-5 普通光学显微镜结构示意图

- 1.目镜 2.镜筒 3.物镜转换器 4.物镜 5.通光孔 6.聚光器 7.光圈 8.反光镜
9.粗调节器 10.细调节器 11.镜臂 12.移片器 13.载物台 14.倾斜关节
15.镜柱 16.镜座 17.照明装置 18.粗调限位环凸柄 19.滤光片框

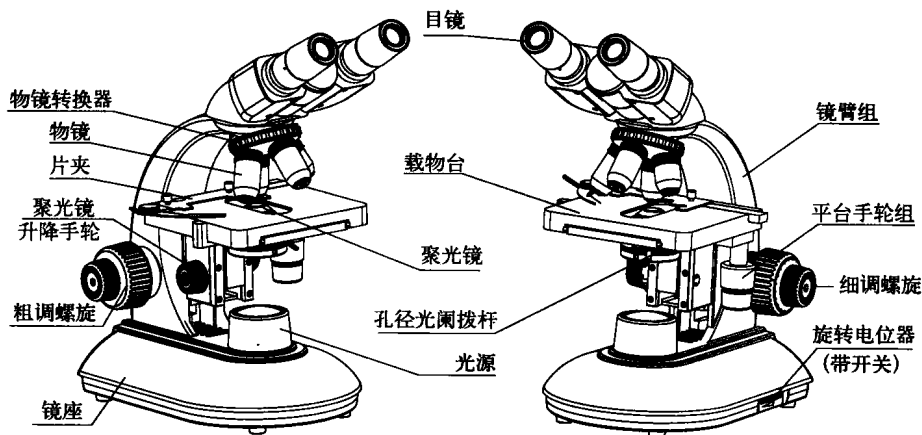


图1-6 新型光镜的结构图(重庆奥特B-203型,LED灯照明,可用自带电池供电)

端可装载目镜,下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式和双筒式两类。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种,而双筒式光镜的镜筒均为倾斜的。镜筒直立式光镜与物镜的中心线(光轴)在同一直线上,而镜筒倾斜式光镜的目镜与镜物的中心线互成 45° 角,在其镜筒中装有能使光线转折 45° 的棱镜。

2. 物镜转换器

物镜转换器(revolving nose - piece)又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状构造,可以按顺时针或反时针方向自由旋转。其上均匀分布有 3~4 个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。转动旋转盘可使不同的物镜到达工作位置(与光路合轴),使用时注意凭手感使所需物镜准确到位。

3. 镜臂

镜臂(arm)为支持镜筒和镜台的弯曲状构造,是取用显微镜时握拿的部位。镜筒直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节,可使镜筒向后倾斜一定角度以方便观察,但使用时倾斜角度不应超过 45° ,否则显微镜由于重心偏移容易翻倒。

4. 调焦器

调焦器(focusing adjustment)也称调焦螺旋,为调节焦距的装置,位于镜臂的上端(镜筒直立式光镜)或下端(镜筒倾斜式光镜),分粗调螺旋(大螺旋)和细调螺旋(小螺旋)两种。粗调螺旋可使镜筒或载物台以较快速度或较大幅度地升降,能迅速调节好焦距使物像呈现在视野中,适于低倍镜观察时的调焦。而细调螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较大幅度地升降(升降距离不易被肉眼观察到),适用于高倍镜和油镜的聚焦或观察标本的不同层次,一般在粗调螺旋调焦的基础上使用,用于焦距的精细调节。

有些类型的光镜,粗调螺旋和细调螺旋重合在一起安装在镜柱的两侧。在右侧粗调螺旋的内侧有一窄环,称为粗调松紧调节轮,其功能是调节粗调螺旋的松紧度(向外转偏松,向内转偏紧)。另外,在左侧粗调螺旋的内侧有一粗调限位环凸柄,当用粗调螺旋调准焦距后向上推紧该柄,可使粗调螺旋限位,此时镜台不能继续上升但细调螺旋仍可调节。

5. 载物台

载物台(stage)是位于物镜转换器下方的方形平台,是放置被观察的玻片标本的地方。平台的中央有一圆孔称为通光孔,来自下方光线经此孔照射到标本上。在载物台上通常装有标本移动器(也称移片器),移片器上安装的弹簧夹可用于固定玻片标本,转动移片器的两个螺旋可使玻片标本前后左右移动,这样寻找目标时较为方便。

在移片器上一般还附有纵横游标尺,可以计算标本移动的距离和确定标本的位置。游标尺一般由主标尺(A)和副标尺(B)组成(图 1-7)。副标尺的分度为主标尺的 $9/10$ 。使用时先看副标尺的 0 点位置,再看主副标尺刻度线的重合点即可读出准确的数值,如图 1-4 中所示的数值应为 26.6 mm。

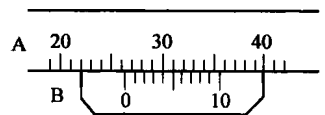


图 1-7 游标尺的用法

6. 镜柱

镜柱(post)是将镜臂与镜座相连的短柱。

7. 镜座

镜座(base)位于最底部的构造,为整个显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。现代的光镜在镜座内一般装有照明光源、电源开关以及调节电压高低以控制光线强弱的电位器。

(二) 光学系统部分

光镜的光学系统主要包括物镜、目镜和照明装置(反光镜、聚光器和光圈等)。

1. 目镜

目镜(ocula)安装在镜筒的上端,起着将物镜所放大的物像进一步放大的作用。每个目镜一般由两个透镜组成,在上下两透镜(即接目透镜和会聚透镜)之间安装有能决定视野大小的金属光阑——视场光阑,此光阑的位置即是物镜所放大实像的位置,故可将一小段细金属丝或头发黏附在光阑上作为指针,用以指示视野中的某一部分供他人观察。另外,还可在光阑的面上安装目镜测微尺。每台显微镜通常配置2~3个不同放大倍率的目镜,常见的有5×、10×和15×(×表示放大倍数)的目镜,可根据不同的需要选择使用,最常使用的是10×目镜。

2. 物镜

物镜(objective)也称接物镜,安装在物镜转换器上。每台光镜一般有3~4个不同放大倍率的物镜,每个物镜由数片凸透镜和凹透镜组合而成,是显微镜最主要的光学部件,决定着光镜分辨力的高低。常用物镜的放大倍数有10×、40×和100×等几种。一般将8×或10×的物镜称为低倍镜(而将5×以下的叫做放大镜);将40×或45×的称为高倍镜;将90×或100×的称为油镜(这种镜头在使用时其顶端须浸在镜油中)。

在每个物镜上通常都刻有能反映其主要性能的参数,主要有放大倍数和数值孔径(如10/0.25、40/0.65和100/1.25)、该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度(160/0.17,单位:mm)等(图1-8)。另外,在油镜上还常标有“油”或“oil”字样。

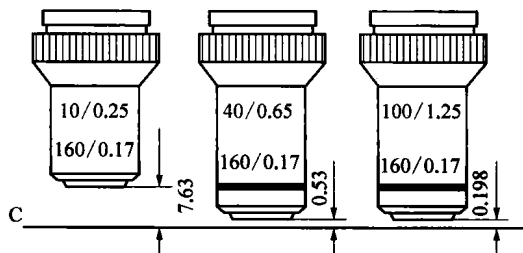


图1-8 物镜的性能参数及工作距离

C线为盖玻片的上表面,10×物镜工作距离为7.63 mm;40×物镜为0.53 mm;100×物镜为0.198 mm(XSB\02型显微镜)。10/0.25、40/0.65、100/1.25表示镜头放大倍数和数值孔径。

160/0.17表示显微镜机械镜长(标本至目镜的距离)和标准盖玻片厚度,即镜长160 mm,盖片厚度0.17 mm

油镜在使用时需要用石蜡油(或香柏油)作为介质,这是因为油镜的透镜和镜孔较小,而光线要通过载玻片和空气才能进入物镜中,玻璃与空气的折光率不同,使部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,而使视野暗淡,物像不清。在玻片标本和油镜之间填充折射率与玻璃近似的石蜡油或香柏油时(玻璃、香柏油和石蜡油的折射率分别为1.52、1.51和1.46,空气为1),可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨率。物镜分辨率的大小取决于物镜的数值孔径,其数值越大,则表示分辨率越高。

不同的物镜有不同的工作距离,所谓工作距离(working distance, WD)是指显微镜处于工作状态时(焦距调好、物像清晰),物镜前透镜的表面与标本(载玻片上表面)之间的距离(图1-8)。不同物镜的工作距离于其放大倍数成反比(表1-1)。如10倍物镜、40倍物镜和100倍物镜的工作距离分别为7.6 mm、0.53 mm和0.19 mm。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,然后只需用细调螺旋稍加调节焦距,便可见到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。掌握高倍镜和油镜工作距离较小的特点后,可避免在使用这两种物镜时沿错误方向调焦,使玻片标本被镜头顶碎。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。

表1-1 标准物镜的性质

放大倍数	数值孔径	工作距离/mm
10×	0.20	6.5
20×	0.50	2.0
40×	0.65	0.6
100×	1.25	0.2

不同的物镜,镜头内透镜的直径有很大的差异,低倍镜的透镜最大,可透过的光线最多;油镜的透镜直径最小,能透过的光线最少;而高倍镜则介于两者之间。因此,在使用三种镜头时,应该注意调节光圈的大小,使视野中的光线和亮度处于合适的状态。显然,使用低倍镜时所需的光圈最小;而使用油镜时需要的光圈最大,三种镜头的透镜直径与光圈的关系见图1-9。

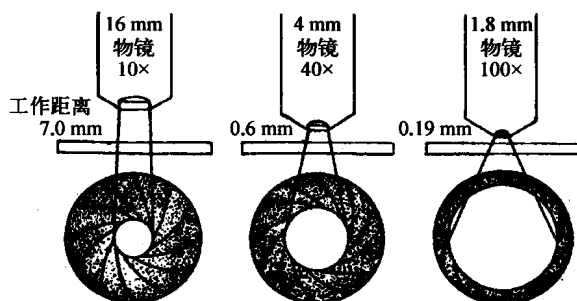


图1-9 物镜透镜的直径与所需光圈大小的关系示意图

3. 聚光器

聚光器(condenser)位于载物台的通光孔的下方,由聚光镜和光圈构成,其主要功能是将光线集中到所要观察的标本上。聚光镜由2~3个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的左下方有一调节螺旋可使其上升或下降,从而调节光线的强弱,升高聚光器可使光线增强,反之则光线变弱。

光圈也称为彩虹光阑或孔径光阑,位于聚光器的下端,是一种能控制进入聚光器的光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成,其外侧有一小柄,可使光圈的孔径开大或缩小,以调节光线的强弱。在光圈的下方常装有滤光片框,可放置不同颜色的滤光片。

4. 反光镜或内置电光源

老式的显微镜多利用玻璃反光镜(reflection mirror)采集光线。反光镜安装在聚光镜的下方,可向各方向转动,能将来自不同方向的光线反射到聚光器中。反光镜有两个面,一面为平面镜,另一面为凹面镜,凹面镜有聚光作用,适于较弱光和散射光下使用,光线较强时则选用平面镜。

目前国内大多数高等医学院校的相关实验室都配置了较新型的内置电光源的双目光学显微镜。内置光源显微镜调节光线的强弱非常方便,可通过一个可调电阻(电位器)调节电压的高低,从而改变灯泡的亮度来实现显微镜视野亮度的调节。

二、光学显微镜的使用方法

(一) 准备工作及观察要求

(1) 将显微镜从实验台下面的柜中或木箱中小心地取出,放置在自己座位前面的实验台上,以镜座后端离实验台边缘约3~6 cm为宜。如果需要较长距离移动显微镜时,应以右手握住镜臂,左手托住镜座的方式搬运。插上电源。

(2) 检查显微镜的各个部件是否完整和正常,如果是镜筒直立式光镜,可使镜筒倾斜一定角度以方便观察。但倾斜一般不应超过45°,否则显微镜重心不稳,易发生倾倒。

(3) 使用双目显微镜时,应该用双眼同时观察视野;双手同时操作镜上的调节装置。一般用左手调节焦距,而用右手操作标本移动尺移动玻片。

(4) 瞳距的调整:瞳距(眼间距)因人而异。所以使用双目显微镜时,应调整显微镜的两个目镜之间的距离。调节时,两眼看着视野,双手分别握住两个目镜的基部上下掰动或左右移动(图1-10),直至双目分别看到的视野重合成一个。换句话说,调节好以后,两眼同时看到的是一个视野。

(5) 视度(屈光度)调节:双目观察调焦时,应先以右筒、右眼观察,使右筒调焦清晰,再从左筒观察,同时调节左筒上的视度调节圈(补偿两眼视度上的差异),使左筒成像与右筒同样清晰。

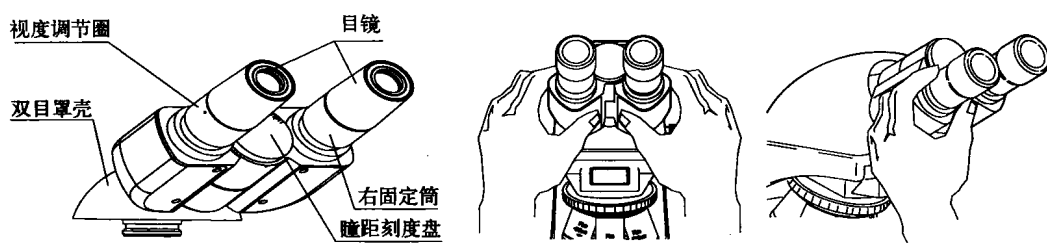


图 1-10 双目瞳距调整与视度调节

(二) 低倍镜的使用方法

1. 调光

将内置光源双目显微镜的电源插上,打开镜座上的电源开关;转动粗调螺旋使载物台下降;再转动物镜转换器,使低倍镜(细胞生物学实验一般用 10 倍的)对准载物台中央的通光孔;调节聚光器使其上升到中间位置,拨动聚光器上的光圈手柄,也使其开到中间位置;双眼分别对准目镜观察视野,进一步调节电压,使视野中的光线均匀,亮度适中。

2. 放片

取一张玻片标本,先对着光线用肉眼观察标本在玻片上的大致位置,再将标本片放置到载物台上用标本移动器上的弹簧夹固定好,注意使有盖玻片或标签的一面朝上。然后转动移片器的螺旋,使需要观察的标本位于物镜的正下方。

3. 调焦

先在眼睛的注视下,调节粗调螺旋使载物台上升,使低倍镜末端与载物台上玻片标本的距离逐渐缩小至 6 mm 以内(因低倍镜的工作距离在 7.6 mm 左右)。操作时须缓慢进行,以避免玻片标本被镜头顶破。然后,眼睛从目镜观察视野,同时缓慢转动粗调螺旋使载物台下降,直至视野中出现标本的物像。此时,再转动细调螺旋,使视野中的物像最清晰。

如果需观察的物像不在视野中央,甚至不在视野内,可用标本移动尺上下左右移动标本的位置使物像进入视野并移至中央。在调焦时,如果镜头与玻片标本的距离已超过了 1 cm 还未见到物像,应重新按调焦的步骤再次操作,直至观察到标本。

(三) 高倍镜的使用

(1) 选定目标:先用低倍镜寻找选定需进一步放大观察的标本部位,并将其移至视野中央,调节焦距,使被观察的物像清晰。

(2) 转换高倍物镜:在肉眼侧视条件下,拨动物镜转换器,使高倍镜头缓慢转至工作状态,即把高倍镜对准载物台的通光孔。

(3) 调节焦距:转换高倍物镜后,在视野中一般可见到模糊的物像(有时也可较为清

晰),只需稍微调节一下细调焦螺旋便可使物像清晰。此时往往需要增加视野的亮度。

有些显微镜,在低倍镜准焦的状态下直接转换高倍镜时会发生高倍物镜碰擦玻片而不能转换到位的情况,此时不能硬转,应检查玻片是否放反、玻片是否过厚以及物镜是否松动等情况后重新操作。如果调整后仍不能转换,则属高倍镜过长,此时应将载物台下降后再转换,然后在眼睛的注视下使高倍镜贴近盖玻片,再边观察目镜视野边用粗调螺旋极缓慢地使载物台下降或镜筒上升,看到物像后再用细调螺旋准焦。

由于制造工艺上的原因,许多显微镜的低倍镜视野中心与高倍镜的视野中心往往存在一定的偏差,因此,在从低倍镜转换高倍镜观察标本时常会给观察者迅速寻找标本造成一定困难。为了避免这种情况的出现,使观察者在高倍镜下能较快找到所需放大部分的物像,可事先利用羊毛交叉装片本来测定所用光镜的偏心情况,并绘图记录制成偏心图。具体操作步骤如下:①在高倍镜下找到羊毛交叉点并将其移至视野中心;②换低倍镜观察羊毛交叉点是否还位于视野中央,如果偏离视野中央,其所在的位置就是偏心位置;③将前面两个步骤反复操作几次以找出准确的偏心位置,并绘出偏心图。当光镜的偏心点找出之后,在使用该显微镜的高倍镜观察标本时,事先可在低倍镜下将需进一步放大的部位移至偏心位置处,再转换高倍镜观察时,所需的观察目标就正好处在视野中央。

(四) 油镜的使用

(1) 用高倍镜选定需要进一步放大观察的标本(细胞),并将其移至移至视野的中央。

(2) 将聚光器升至较高位置并将光圈开至最大(油镜所需光线较强)。

(3) 转开高倍镜,往玻片标本上需观察的部位滴一滴镜油(香柏油或石蜡油)作为介质,然后在眼睛的注视下,使油镜转至工作状态,此时油镜的下端镜面一般应正好浸在油滴中或与油滴接触。也可先稍稍下降载物台,使油镜对准通光孔,再转动粗调螺旋使油镜下端浸入油滴中并贴近盖玻片。

(4) 眼睛观察目镜视野,小心转动细调螺旋使载物台缓慢下降,直至视野中出现清晰的物像。操作时尽可能不要反方向转动细调螺旋,以免镜头顶碎细胞或组织标本片。

在观察时,如发现视野中的某标本不知是何物而需要老师或同学帮助观察确定时,可将视野中的指针(装在目镜中的头发或细铜丝)对准有疑问的标本。如果镜中未装指针,可将视野看成一个带有时间标记(如3、6、9、12)的钟面,指出有疑问标本位于几点钟的所在位置。

(5) 油镜使用后,必须及时将镜头上的油擦拭干净。操作时先将油镜升高1 cm并将其转离通光孔,先用干擦镜纸揩擦一次,把大部分的油去掉,再用沾有少许无水乙醇或镜头清洁剂的擦镜纸擦一次,最后用干擦镜纸擦一次。

至于玻片标本上残留的镜油,如果是带有盖玻片的永久制片,可直接用上述方法擦干净;如果是无盖玻片的标本,则载玻片上的油可用拉纸法揩擦,即先把一小张擦镜纸盖在油滴上,再往纸上滴几滴无水乙醇或镜头清洁剂,趁湿将纸往外拉,如此反复几次即可使玻片上的镜油基本去掉。

显微镜使用完毕后,应取下需保存的玻片标本(永久制片)放回到片盒。再将物镜转离通光孔。最后套上塑料防尘罩,放回到实验台下方的柜中或镜箱中备用。