

全国高等学校配套教材
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学 实验指导及习题集

主 编 章静波



人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学实验指导及习题集/章静波主编.

—北京:人民卫生出版社,2004.12

ISBN 7-117-06542-7

I. 医… II. 章… III. 人体细胞学:细胞生物学-医学院校-自学参考资料 IV. R329.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 122823 号

医学细胞生物学实验指导及习题集

主 编:章 静 波

出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印 刷:北京人卫印刷厂(天运)

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:17

字 数:391 千字

版 次:2004 年 12 月第 1 版 2004 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 7-117-06542-7/R·6543

定 价:22.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

在许多大学,细胞生物学被看做是一门理论课,没有实验操作的安排。事实上,细胞生物学这门学科既具有很强的理论性也具有很强的实践性。

毫无疑问,不会使用显微镜,你就很难全面地了解细胞究竟是什么样子的;不掌握组织化学与免疫化学染色方法,你很难想象细胞的成分及其分布是如此绚丽多姿;不懂得细胞培养技术,你就不会深刻了解什么是细胞的正常生长行为与恶性行为……诚然,这些只是细胞生物学中最常用、最基础的操作,但是,只有掌握了这些最基本的技术方法,你才能登堂入室,进入细胞生物学的知识殿堂,运用更新、更尖端的技术开始自己无穷的探索。

纵观最近几年诺贝尔医学/生理学奖,无一不属于细胞生物学范畴或与细胞生物学密切相关。例如:2003年的诺贝尔医学/生理学奖与细胞膜通道有关,2002年与细胞凋亡有关,2001年与细胞周期有关,2000年与神经传导有关,1999年与细胞内信号系统有关等,这些工作都是与实验设计、实验对象尤其与分子细胞生物学实验技术分不开的。正由于细胞生物学目前已成为“大科学”(“Big Science”, Nature 2002, 420 [6916] 封面语),因此不但有很深邃的理论而且技术方法也愈来愈精湛,要求设备及条件也愈来愈高。大学生当然不可能在短时间内穷尽所有的现代技术与方法,但是只有掌握了最基本的、最重要的实验技巧,方能赢得今后一展身手的机会。这就是我们编写此书的目的。

根据各参编大学教师们的经验以及有关国外资料,我们认为对于医学生来说细胞生物学方法应当分为三类:一类是必须掌握的,一类是必须见习的,一类是至少要具有感性认识的。因此,我们参考了美国冷泉港出版社出版的《细胞实验室手册》(Cell: A Laboratory Manual)以及国内有关细胞生物学的实验方法与技术的书籍,将本书定位于“基础而不乏新颖”,主要适用于本科医学生,但对研究生,甚至对生命科学其他分支学科的师生们也有一定的参考价值。但是鉴于国情与“校情”,我们在编写此书时内容远比《细胞实验手册》少,而比一般学校所安排的多,为此使用者可以根据本校的具体情况加以灵活更动与增减。

综上所述,我们认为该书的特点是实用、易行,意在培养大学生们的动手能力,掌握最基本的操作技能,同时又晓以当前的尖端方法学,并以此作为“入门”的起步点。另外,一位哲人说过“没有理论的实践是盲目的实践”,因此在本书的后半部分附有细胞生物学习题,可以充实您从事技术操作的理论基础。直白地说,对于您考试取得好成绩或许也有一些帮助。因此,我们相信从事细胞生物学研究与学习细胞生物学的人们将从本书中获益匪浅。

编 者

目 录

第一部分 实验指导	1
第一章 显微镜技术	1
实验一 普通显微镜的构造及使用方法	1
实验二 相差显微镜的构造及使用方法	5
实验三 荧光显微镜的构造及使用方法	7
实验四 透射电子显微镜的构造及使用方法	10
实验五 扫描电子显微镜的构造及使用方法	15
第二章 细胞结构与成分的显示技术	19
实验六 细胞中 DNA 和 RNA 的显示	19
实验七 细胞中过氧化物酶的显示	25
实验八 细胞中碱性蛋白的显示	27
实验九 细胞中线粒体的活体染色	28
实验十 细胞中液泡系的活体染色	30
实验十一 细胞中糖原和脂类的显示	32
实验十二 细胞中溶酶体的显示 (酸性磷酸酶)	36
实验十三 细胞中微丝的染色及形态观察	38
实验十四 微管的间接免疫荧光显示与观察	41
第三章 细胞生理	45
实验十五 细胞的吞噬活动	45
实验十六 细胞的运动	47
实验十七 细胞膜的通透性测定	50
第四章 细胞培养和分析	53
实验十八 细胞的原代培养	53
实验十九 细胞的传代培养	57
实验二十 细胞的冻存与复苏	59
实验二十一 培养细胞的形态观察和计数	61
实验二十二 细胞的显微测量技术	65
实验二十三 培养细胞生长曲线的绘制和分裂指数的测定	66
实验二十四 细胞集落形成实验	69
实验二十五 MTT 对细胞生长状况的检测	72
实验二十六 细胞周期的同步化试验	74
实验二十七 流式细胞仪检测细胞周期	75

实验二十八 骨髓间充质干细胞的培养及其体外诱导分化	77
第五章 细胞成分的分离与分析	80
实验二十九 差速离心法分离细胞器	80
实验三十 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	83
实验三十一 蛋白质的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	85
实验三十二 Western 印迹技术	91
实验三十三 免疫沉淀法	93
实验三十四 DNA 提取及检测	96
实验三十五 RNA 提取及检测	99
第六章 细胞工程基础技术	102
实验三十六 鸡血细胞的融合	102
实验三十七 染色体提前凝集标本的制备	104
实验三十八 单克隆抗体的制备	108
实验三十九 显微注射技术(核移植)	112
实验四十 DNA 转染实验(绿色荧光蛋白)	114
第七章 细胞凋亡的测定	122
实验四十一 凋亡细胞的光镜下形态观察	122
实验四十二 凋亡细胞的电镜下形态观察	126
实验四十三 凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳检测——DNA ladder	128
实验四十四 凋亡细胞的原位末端标记法检测	130
实验四十五 凋亡细胞的流式细胞法检测	132
第八章 染色体技术	134
实验四十六 染色体标本的制备	134
实验四十七 染色体显带技术	138
实验四十八 性染色质的制备	145
实验四十九 染色体原位杂交技术	149
第九章 分子细胞生物学技术	155
实验五十 Southern 印迹技术	155
实验五十一 Northern 印迹技术	159
实验五十二 原位 PCR 技术	164
实验五十三 定量 PCR 技术	167
实验五十四 RNA 干扰技术	170
参考文献	175
第二部分 习题集	177
第一章 绪论	177
第二章 细胞的起源与进化	180
第三章 细胞生物学的研究方法和手段	183
第四章 细胞内的分子	187

第五章	细胞膜的结构	192
第六章	物质的跨膜运输与信号转导	196
第七章	细胞连接与细胞粘连	201
第八章	细胞外基质	204
第九章	细胞的内膜系统	209
第十章	囊泡转运	215
第十一章	线粒体	219
第十二章	细胞骨架	226
第十三章	细胞核	231
第十四章	蛋白质的合成	237
第十五章	细胞的信号转导	243
第十六章	细胞增殖和细胞周期	250
第十七章	细胞分化	254
第十八章	细胞衰老与死亡	260

第一部分 实验指导

第一章 显微镜技术

实验一 普通显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 掌握低倍镜、高倍镜的正确使用方法。
2. 熟悉油镜的使用方法。
3. 了解普通显微镜的构造及成像原理。

【实验原理】

显微镜的主要部件是物镜和目镜，均为凸透镜。物镜的焦距短，目镜的焦距较长。物镜到被观察物 AB 的距离稍大于物镜的焦距，通过物镜得到倒立的放大的实像 A'B'。A'B'对目镜来说是物体，使 A'B'位于目镜的焦点以内，这样通过目镜就得到 A'B'的放大的虚像 A''B''。从图上可以看出，A''B''的视角比眼睛直接看 AB 时的视角大得多，所以用显微镜可以看清非常微小的物体（图 1-1）。

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
a 字片	4 张
红绿羊毛交叉片	4 张
人血涂片	4 张
双层油镜瓶	1 瓶
擦镜纸(剪成 2cm×3cm 大小)	1 培养皿
普通显微镜	4 台

【分组形式】

每组 4 人。

【操作步骤】

（一）普通显微镜的主要构造

普通显微镜由三部分组成：机械部分、照明部分和光学部分（图 1-2）。

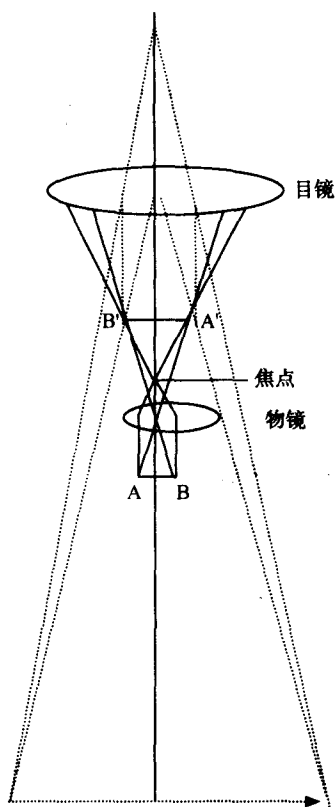


图 1-1 普通显微镜成像光路图

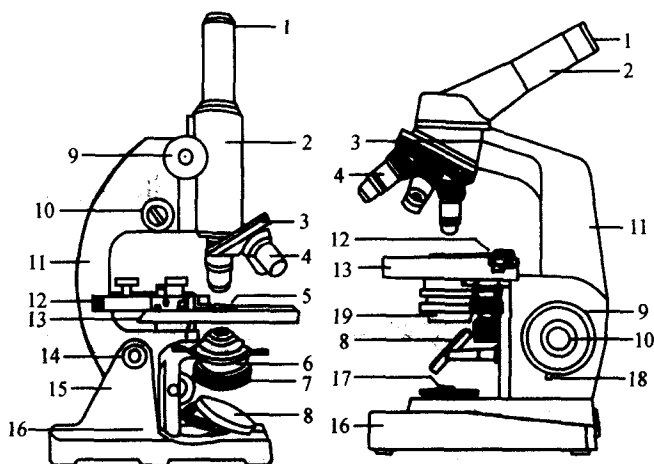


图 1-2 普通显微镜 (左图为直立式镜筒, 右图为倾斜式镜筒)

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

1. 机械部分

(1) 镜座：显微镜的底座，稳定和支持整个镜体。

(2) 镜柱：镜座上面直立的短柱，连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂：镜柱上方的弯曲部分，支持镜筒与载物台，取放显微镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有可活动的倾斜关节，可使镜臂适当倾斜，便于观察；镜筒倾斜式显微镜的镜臂与镜柱连为一体，无倾斜关节。

(4) 镜筒：镜臂前上方的圆筒。镜筒上端安装目镜，下端安装物镜转换器，并且保护成像的光路与亮度。镜筒有单筒式和双筒式，前者又有直立和倾斜式两种，后者均为倾斜式。

(5) 物镜转换器：镜筒下方的圆盘状部件，盘上有 3~4 个圆孔，安装了不同放大倍数的物镜，转动物镜转换器，可以更换不同放大倍数的物镜。

(6) 镜台（载物台）：放置标本片的平台，中央有通光孔，光线通过此孔照射在标本片上，镜台上安装有玻片移动器，用以夹持玻片，并使玻片能够前后、左右移动。

(7) 调节器：装在镜臂或镜柱两侧的粗细螺旋，用以调节焦距。

①粗调节器（粗螺旋）：转动时可使镜台（镜筒倾斜式显微镜）或镜筒（镜筒直立式显微镜）大幅度升降，迅速调节物镜和标本间距离使物像出现在视野中。在使用低倍镜时，先用粗调节器找到物像。

②细调节器（细螺旋）：转动时可使镜台或镜筒短距离升降，使用高倍、油镜时或低倍镜下为了得到更清晰的物像时使用。

2. 照明部分

安装在载物台下方，包括反光镜、聚光器、光圈。

(1) 反光镜：安装在镜座上的平、凹两面镜，可向任意方向转动，将光线反射到聚光器。凹面镜聚光作用强，光线较弱的时候使用；平面镜聚光作用弱，光线较强时使用。

电光源普通显微镜没有反光镜，一般在镜座内安装有照明装置，光线的强弱由底座上的光亮调节钮控制。

(2) 聚光镜：由一组透镜组成，汇聚光线使其照射到标本上，升降聚光器可以调节视野中光亮的强弱。

(3) 光圈：在聚光镜下方，由一组金属薄片组成，其外侧伸出一柄，拨动它可调节其开孔的大小，控制通过的光量。

3. 光学部分

(1) 目镜：安装在镜筒上端，通常备有 2~3 个，上面刻有 5×、10×或 15×符号表示放大倍数，一般用 10×目镜。

(2) 物镜：安装在物镜转换器上，一般有 3~4 个物镜，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 100/1.30；镜筒长度和所要求的盖玻片厚度：160/0.17（mm）（见表 1-1）。

表 1-1 不同倍数物镜的比

镜头	放大倍数	镜身	镜口率	工作距离(mm)
低倍镜	10×	短	0.25	5.40
高倍镜	40×	较长	0.65	0.39
油镜	100×	最长	1.30	0.11

镜口率（numerical aperture, N. A.）反映该物镜分辨力的大小，数字愈大，分辨力愈高。分辨力是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力，这个可分辨的最小间隔距离越近，分辨力越高。人的分辨力可达 0.1mm，显微镜的分辨力能达到 0.2μm。

$$R=0.61\lambda/N.A. \quad N.A.=n \cdot \sin(\alpha/2)$$

R 为分辨力，λ 为光波波长，N. A. 为镜口率，n 为介质折射率，α 为透镜视锥顶角，折射率大的介质（例如：香柏油的折射率为 1.515，空气的折射率为 1）分辨力也大。

工作距离指物像调节清楚时物镜下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（图 1-3）。

(二) 普通显微镜的使用方法

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置：取显微镜时，右手握住镜臂，左手托住镜座，将其轻放在操作者前方略偏左侧，显微镜离实验台边缘应有至少一拳的距离。

(2) 对光：转动粗调节器，使镜

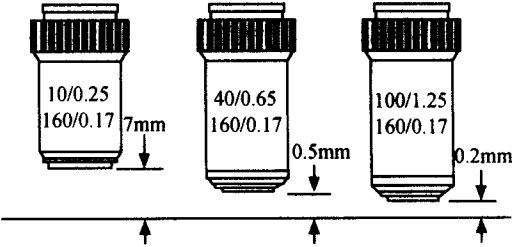


图 1-3 不同倍数物镜的工作距离

台下降（镜筒直立式显微镜需升高镜筒），使物镜与载物台距离拉开，转动物镜转换器，使低倍镜对准通光孔（转动时听到咔哒声时，表明物镜光轴已对准镜筒中心），打开光圈，上升聚光器，将反光镜凹面转向光源，一边在目镜上观察，一边调节反光镜方向，直到视野内的光线明亮且均匀为止。

若使用电光源显微镜，首先打开显微镜电源开关，然后使低倍镜对准镜台，开大光圈，上升聚光器并调节光亮调节钮至视野内光线明亮适中。

（3）放置标本片：取标本片，盖玻片面朝上放在镜台上，用玻片移动器将待观察部位移到通光孔的正中。

（4）调节焦距：从显微镜侧面注视着物镜镜头，同时转动粗调节器，使镜台上升（镜筒直立式显微镜下降镜筒）至物镜距标本片约 5mm 处，然后一边在目镜上观察，一边缓慢转动粗调节器，使镜台缓慢下降（镜筒直立式显微镜上升镜筒）至视野中出现清晰的物象。

如果看不到物象，可能由以下原因造成：

- ①物镜未对正通光孔，应对正后再观察。
- ②标本未放到视野内，应移动标本至通光孔中央。
- ③调节器转动得太快，超过焦点，应重新调焦。
- ④视野内光线太强，不易观察到未染色的标本片，将光线调暗一些再观察。

2. 高倍镜的使用方法

（1）选好目标：一定要先在低倍镜下把待观察部位移动到视野中心，将物像调节清晰。

（2）转换高倍物镜：为防止镜头碰撞玻片，从显微镜侧面注视着，慢慢地转动转换器使高倍镜头对准通光孔。

（3）调节焦距：向目镜内观察，一般能见到一个模糊的物象，稍稍调节细螺旋，即获得清晰的物像。若视野亮度不够，可上升聚光器和开大光圈。

3. 油镜的使用方法

（1）选好目标：必须先在低、高倍镜下观察，将待观察部位移到视野中心。

（2）转换油镜：转动转换器，使高倍镜头离开通光孔，在玻片观察部位滴一滴香柏油，然后从侧面注视着镜头与玻片，慢慢转换油镜使镜头浸入油中。

（3）调节光亮：将聚光器上升到最高位置，光圈开到最大。

（4）调焦：一边观察目镜，一边稍稍调节细螺旋器，物像清晰。

若目标不理想或不出现物像需要重找，在加油区之外重找应按：低倍→高倍→油镜程序。在加油区内重找应按：低倍→油镜程序，以免油沾污高倍镜头。

（5）擦净油镜头：使用完毕，先用擦镜纸滴少许二甲苯将镜头上和标本上的香柏油擦去，再用干净擦镜纸擦干净。

（三）操作练习

1. 低倍镜使用练习

取 a 字片一张，先用眼直接观察 a 字的方位和大小，然后按照低倍镜的使用方法练习对光、调焦。注意观察物像是反是正，标本移动的方向与视野中物像移动方向是否相同。

2. 高倍镜使用练习

取红绿羊毛交叉片，先在低倍镜下找到羊毛，并将红绿羊毛的交叉点移到视野的中心，然后换高倍镜观察，注意分辨红绿羊毛的上下位置关系（利用细螺旋升降镜台进行判断）。

3. 油镜使用练习

取人血涂片，先用低倍镜、高倍镜观察，再换油镜观察。比较三种放大倍数的物镜的分辨力并练习擦拭油镜头和标本片。

【观察与记录】

1. a 字片在低倍镜下呈倒立的物像，且玻片的移动方向与视野内物像移动的方向相反。

2. 红绿羊毛交叉片在高倍镜下，逆时针上升镜筒时红色羊毛清晰，表明红色羊毛位于交叉点上方，顺时针下降镜筒时，绿色羊毛清晰，绿色羊毛在交叉点的下方。

3. 观察人血细胞涂片时，低倍镜、高倍镜、油镜对标本的观察范围依次减少，但放大倍数、分辨力依次增强。以粒细胞为例：低倍镜下只见细胞中央有被染成紫色的核物质，高倍镜下可见其核为叶状，细胞质中具有大小不等的颗粒。油镜下颗粒更大、更清晰。

【注意事项】

1. 取放显微镜时要轻拿轻放，持镜时必须一手握镜臂、另一手托住镜座，不可单手提取，以免零件脱落或碰撞到其他地方。

2. 不可把显微镜放置在实验台的边缘，镜筒倾斜角度不得超过 45° ，以免碰翻落地。

3. 在上升镜台（或下降镜筒）、转换物镜时，一定要从显微镜的侧面注视着，切勿边操作边在目镜上观察，以免物镜与标本片相碰，造成镜头或标本片的损坏。

4. 需要更换标本片时，使镜台与物镜头远离，方可取下标本片。

5. 标本片上待观察部位要对准通光孔中央，且不能放反，否则高倍镜和油镜下找不到物像。

6. 转换物镜时应转动物镜转换器，切忌手持物镜移动。

7. 显微镜使用完毕后，必须复原，其步骤是：取下标本片，转动转换器使镜头离开通光孔，下降载物台，竖立反光镜，下降聚光器（但不要接触反光镜）、关闭光圈，玻片移动器回位，盖上网布或外罩，放回显微镜柜内。

8. 保持显微镜清洁，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，机械部分可以用布擦拭。

（邵红莲）

实验二 相差显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 熟悉相差显微镜的正确使用方法。
2. 了解相差显微镜的构造及工作原理。

【实验原理】

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。光波通过物体时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，波长和振幅并不发生变化，因细胞各部分微细结构的折射率和厚度略有不同，光波通过时，仅相位有变化（相应发生的差异即相差），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。因此可用以观察活细胞或未染色标本。

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
HeLa 细胞	1 培养瓶
相差显微镜	1 台

【分组形式】

每组 6 人。

【操作步骤】

（一）相差显微镜的构造

相差显微镜（图 1-4）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，用带相板的物镜代替普通物镜，并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑是环状孔形成的光阑，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形成的像从一些衍射像中分出来。相板安装在物镜的后焦点处，相板除能推迟直射光线或衍射光的相位以外，还能吸收光使亮度发生变化。调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时，聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上，必需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。

倒置显微镜组成和普通显微镜一样，只不过物镜与照明系统颠倒，物镜安装在载物台的下方，光源及聚光器安装在载物台的上方

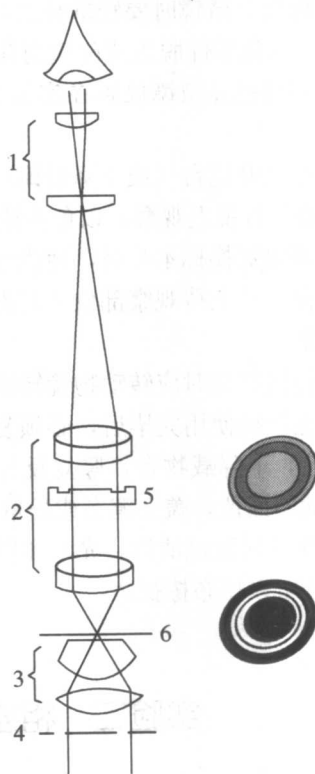


图 1-4 相差显微镜光路图示

1. 目镜 2. 物镜 3. 聚光器 4. 环状光阑
5. 相板 6. 标本

(图 1-5)。倒置相差显微镜 (inverted phase contrast microscope) 常用于观察培养瓶或培养板中的活细胞。

(二) 倒置相差显微镜的使用

1. 打开光源, 一般在环状光阑下面选择绿色滤光片置于光路中, 它可吸收红色和蓝色光, 使波长范围小的单色光线进行照明, 并有吸热作用, 能使相差观察获得良好的效果。此滤光片放置好后一般不再每次更换。

2. 合轴调整 将合轴望远镜换入目镜筒内, 一边向望远镜内观察, 一边用右手转动望远镜内筒使其下降, 当对准焦点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。再升降聚光器并调节其下的螺旋

使亮环的大小与黑环一致, 然后前后左右调节环状光阑聚光器上的调节钮, 使两环完全重合。合轴调整完毕, 抽出望远镜, 换回目镜, 按常规要领进行观察。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和重新合轴调整。

3. 调焦 旋转物镜转换器, 使低倍相差物镜进入光路, 按普通显微镜常规操作方法进行对光和调焦。使用过程必须使环状光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应。例如: 使用 $40\times$ 相差物镜, 应选用 $40\times$ 标示孔的光阑。

(三) 倒置相差显微镜使用练习

观察培养瓶或培养板中的 HeLa 细胞。

【观察与记录】

在倒置相差显微镜下观察活细胞, 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。

【注意事项】

1. 载玻片或培养瓶必须平整、均匀; 标本不能太厚, 否则相差显微镜成像效果不好。
2. 本要在有水的环境中 (如培养液或用水封片) 成像效果才明显。

(邵红莲)

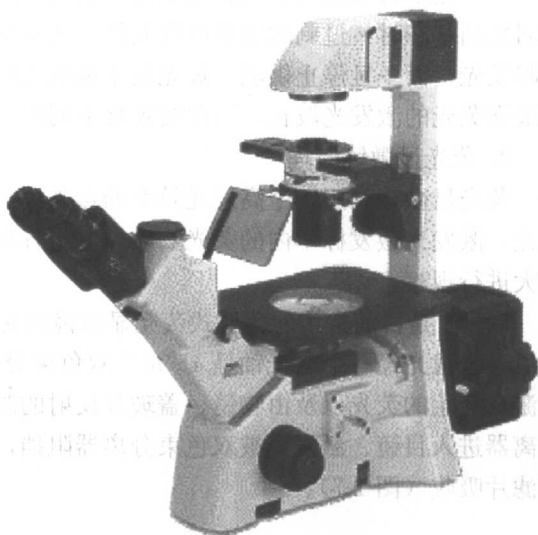


图 1-5 倒置相差显微镜

实验三 荧光显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 熟悉荧光显微镜的正确使用方法。
2. 了解荧光显微镜的构造及工作原理。

【实验原理】

1. 荧光的产生

一些化学物质经短波高能光激发后能吸收并储存能量而进入激发态，当其从激发态再回复到基态时，过剩的能量以荧光的形式发射。荧光发射的特点是在接受能量后即刻引起发光，而一旦停止供能，荧光现象也随之瞬间消失；而且每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长，因此要观察不同荧光应选用不同波长的激发光。

2. 荧光显微镜原理

荧光显微镜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作为激发光，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。

图 1-6 是目前常用的落射式荧光显微镜的光路图，高压汞灯发出的光经激发滤片选择后，激发光经一个与光轴呈 45°角的双色束分离器从物镜向下落射到标本表面，样品被激发产生的荧光以及由物镜、盖玻片反射的激发光同时进入物镜，荧光可通过双色束分离器进入目镜、激发光被双色束分离器阻挡，少量通过双色束分离器的激发光再被阻断滤片吸收（图 1-7）。

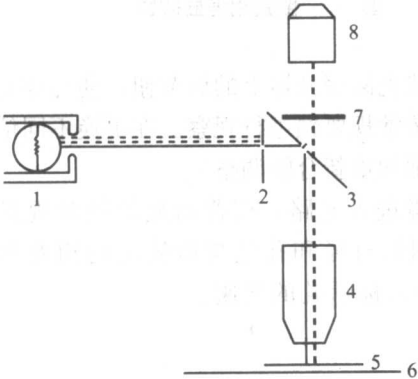


图 1-6 落射式荧光显微镜光路图

1. 高压汞灯 2. 激发滤片 3. 双色分离器 4. 物镜 5. 标本 6. 载物台 7. 阻断滤片 8. 目镜

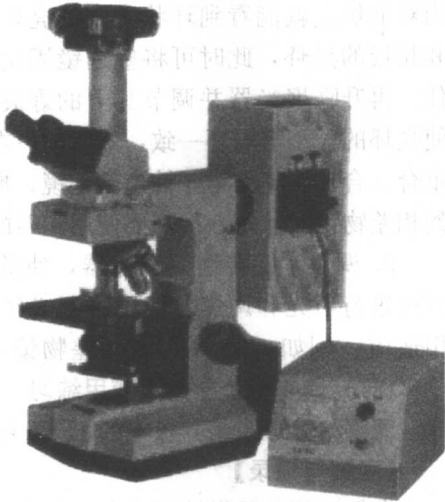


图 1-7 落射式荧光显微镜照片

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
人口腔黏膜上皮细胞临时制片	6 张
95%乙醇	1 染色缸
0.01%吖啶橙染液	1 滴瓶(10ml)
洁净载玻片	6 张
盖玻片	6 片
眼科镊	2 把
吸水纸(约 2cm×3cm 大小)	1 培养皿
荧光显微镜	1 台

【分组形式】

每组 6 人。

【操作步骤】

(一) 荧光显微镜的构造

荧光显微镜比普通光学显微镜多一些附件，如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等。

1. 光源

普遍采用 100~200W 的超高压汞灯，它能发射很强的紫外和蓝紫光，足以激发各类荧光物质。此外荧光显微镜一般同时也配有普通光源，以方便标本上观察目标的寻找。

2. 滤色系统

滤色系统是荧光显微镜的重要部位，由激发滤片和阻断滤片组成。

(1) 激发滤片：透过能使标本产生荧光的特定波长的光，同时阻挡对激发荧光无用的光。一般有紫外、紫色、蓝色和绿色激发滤片，各自提供一定波长范围的激发光。

紫外光激发滤片：可使 400nm 以下的紫外光通过。

紫外蓝光激发滤片：可使 300~450nm 范围内的光通过。

紫蓝光激发滤片：可使 350~490nm 的光通过。

蓝绿光激发滤片：可使 500nm 的光通过。

(2) 阻断滤片：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滤片。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。

3. 聚光镜

荧光显微镜的聚光器有明视野聚光器和暗视野聚光器两种。明视野聚光器聚光力强，使用方便，适于观察低、中倍放大的标本。暗视野聚光器产生黑暗的背景，从而增强了荧光图像的亮度和反衬度，提高了图像的质量，能发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

4. 双色束分离器：与光轴呈 45°角，可使激发光向下落射到标本表面，样品被激发后产生荧光，荧光能通过双色束分离器到达目镜，而未被标本吸收的激发光返回后被双色束分离器阻挡。

5. 阻光挡板

将此挡板推进光路，可遮挡激发光通过光路进入物镜，便于操作者用普通光学显微镜通路寻找待观察部位，拉出该挡板，荧光光路接通，可用于荧光的观察。

6. 物镜

一般有 10×、20×、40×、60×物镜。

7. 目镜

一般有 5×和 6.3×目镜。

(二) 荧光显微镜的使用

1. 启动高压汞灯：打开电源开关，当电压表稳定在 220V 或指示灯变亮后按启动

键，汞灯点燃。预热几分钟后汞灯才能达到最亮点，此时可以进行标本片的观察。

2. 放置标本片

3. 先关闭阻光挡板，用普通显微镜光路找到待观察的细胞部位，调节焦距使物像清晰。

4. 关闭普通光源，选择针对所观察的荧光的合适激发滤片及阻断滤片，拉开阻光挡板，这时显微镜转换到荧光光路，观察标本，调节细螺旋便可得到清晰的荧光图像。用油镜观察标本时，必须用无荧光的特殊镜油或无荧光甘油。

(三) 荧光显微镜的使用练习

取干净载玻片，用牙签刮取口腔黏膜上皮细胞涂在载玻片上，待载玻片上细胞稍干后以 95%乙醇固定 5min，然后晾干滴加荧光染色液染 2min，PBS 漂洗后盖上盖玻片放置荧光显微镜上观察。选用紫外光激发滤片。

【观察与记录】

可见经 0.01% 的吖啶橙荧光染料染色的细胞，细胞核和细胞质被激发产生绿色和橙红色两种不同颜色的荧光。

【注意事项】

1. 点燃汞灯后不可立即关闭，以免灯水银蒸发不完全损坏电极，一般 15min 后才可关闭。

2. 高压汞灯关闭后不能立即重新打开，需经 5min 汞灯冷却后才能再启动，否则会影响汞灯寿命。

3. 防止紫外线对眼睛的损害，观察过程应戴上防护眼镜。

4. 荧光显微镜光源寿命有限，标本应集中观察，每次使用最多不超过 2~3h。

5. 高压汞灯能散发大量热能，灯室必须有良好的散热条件，工作环境温度不宜太高。

6. 标本染色后立即观察，时间久了荧光会逐渐减弱。

7. 在激发光持续照射下标本上的荧光会衰减或淬灭，应避免长时间的在荧光下观察同一部位。

(邵红莲)

实验四 透射电子显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 了解透射电镜的基本结构和工作原理。
2. 熟悉透射电镜常规生物标本制备方法及观察。

【实验原理】

透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 的工作原理是以电子束作照明源，利用电子流的波动性，经电磁场的作用改变电子前进轨迹，产生偏转、聚焦，因此当电子束透过样品经电磁透镜的作用可放大成像。高速运动的电子流其波长远比光波波长短，所以电镜分辨率比光镜高，可达 0.14nm，放大倍率达 80 万倍。由阴极发射的电子经高压加速、聚光镜聚焦形成快速电子流，投射到样品上，与样品中各种原

子的核外电子发生碰撞,形成电子散射。细胞质量、密度较大的部位,电子散射度强,成像较暗;质量、密度较小的部位电子散射弱,成像较亮,结果在荧光屏上形成与细胞结构相应的黑白图像。

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
1. 家兔	1 只
2. 乙醚	2~3ml
3. 2.5%戊二醛	0.1ml
4. 0.1mol/L(pH 值 7.4)二甲砷酸钠缓冲液	0.3ml
5. 1%OsO ₄	0.1ml
6. 30%、50%、70%乙醇溶液	0.1ml
7. 80%、90%、95%丙酮溶液	0.1ml
8. 100%丙酮溶液	0.2ml
9. 3:1 的 100%丙酮溶液与包埋剂的混合液	0.1ml
10. 1:1 的 100%丙酮溶液与包埋剂的混合液	0.1ml
11. 1:3 的 100%丙酮溶液与包埋剂的混合液	0.1ml
12. 环氧树脂(Epon 812)包埋剂	0.05ml
13. 醋酸铀染液	0.3ml(染 1 片)
14. 柠檬酸铅染液	0.3ml(染 1 片)
15. 蒸馏水	0.5ml
16. 双蒸水	1ml
17. 0.1mol/L NaOH 染液	0.1ml
18. 平皿 平皿盖	各 2 个
19. 青霉素小瓶、注射器(2ml~5ml)、滴管等	各 1 个
20. 医用胶布	1 小块
21. 滤纸	1 小片
22. 新单面刀片 石蜡(块或片)	各 1 个
23. 新双面刀片	3 个
24. 解剖器材	1 套
25. 铜网、睫毛笔、牙签、玻璃切片刀或钻石刀	各 1 个
26. 冰盒、包埋模具、恒温箱、冰箱	各 1 个
27. 解剖镜、制刀机、超薄切片机、透射电子显微镜	各 1 个

【分组形式】

7~8 人一组比较合适。

【操作步骤】

(一) 透射电镜的主要结构

透射电子显微镜主要由电子光学系统、真空系统和供电系统三大部分组成(图 1-8)。