

全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



细胞生物学实验

白占涛 李先文 何玉池 主编

Cell Biology Experiment



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

细胞生物学实验

主 编	白占涛	延安大学
	李先文	信阳师范学院
	何玉池	湖北大学
副主编	余晓丽	武汉轻工大学
	刘忠虎	河南农业大学
	屈长青	阜阳师范学院
	肖辉海	湖南文理学院
编 委	(以姓氏笔画为序)	
	白占涛	延安大学
	刘忠虎	河南农业大学
	汤行春	湖北大学
	李先文	信阳师范学院
	肖辉海	湖南文理学院
	何玉池	湖北大学
	何建民	天津医科大学
	余晓丽	武汉轻工大学
	宋 鹏	河南科技大学
	张建萍	塔里木大学
	武 燕	大庆师范学院
	屈长青	阜阳师范学院

华中科技大学出版社

内 容 简 介

本书在编写时既注重基础性和系统化,又突出反映目前细胞生物学的研究现状和发展趋势。本书共分7个部分。第1部分为显微镜技术,包括光学显微镜技术和电子显微镜技术两个方面。第2到第7部分包括细胞亚显微结构的分离和观察、细胞生理学技术、细胞结构与化学成分的检测技术、细胞培养与细胞工程技术、染色体的观察以及细胞重大生命活动的研究等内容,涵盖细胞生物学基本操作技术,验证性、综合性和设计性等不同层面的实验,配合细胞生物学授课内容,侧重培养学生分析问题与解决问题的能力 and 严谨的科学态度,促进学生学科逻辑素养的形成。

本书由来自全国多所高等院校富有细胞生物学实验教学和研究经验的一线教师共同编写。编写中侧重培养学生的实践动手能力和创新性科学思维,突出强调每个实验的可操作性。精选的实验内容可供各高校依据自身教学实践资源和课时安排自主选择。

本书作为全日制教材,可作为综合性、师范类、农林、医学等院校相关专业本科生的细胞生物学实验教材使用,也可供研究生、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/白占涛,李先文,何玉池主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.3
ISBN 978-7-5609-9696-7

I. ①细… II. ①白… ②李… ③何… III. ①细胞生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q2-33



细胞生物学实验

白占涛 李先文 何玉池 主编

策划编辑:罗 伟
责任编辑:程 芳
封面设计:刘 卉
责任校对:张 琳
责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:13.5 插页:2

字 数:356千字

版 次:2014年6月第1版第1次印刷

定 价:32.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教指委主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

陈爱葵	胡仁火	李学如	刘宗柱	施文正	王元秀	张 峰
程水明	胡位荣	李云玲	陆 胤	石海英	王 云	张 恒
仇雪梅	贾建波	李忠芳	罗 充	舒坤贤	韦鹏霄	张建新
崔韶晖	金松恒	梁士楚	马 宏	宋运贤	卫亚红	张丽霞
段永红	李 峰	刘长海	马金友	孙志宏	吴春红	张 龙
范永山	李朝霞	刘德立	马三梅	涂俊铭	肖厚荣	张美玲
方 俊	李充璧	刘凤珠	马 尧	王端好	徐敬明	张彦文
方尚玲	李 华	刘 虹	马正海	王金亭	薛胜平	郑永良
耿丽晶	李景蕻	刘建福	毛露甜	王伟东	闫春财	周 浓
郭晓农	李 梅	刘 杰	聂呈荣	王秀丽	杨广笑	朱宝长
韩曜平	李 宁	刘静雯	彭明春	王永飞	于丽杰	朱长俊
侯典云	李先文	刘仁荣	屈长青	王有武	余晓丽	朱德艳
侯义龙	李晓莉	刘忠虎	邵 晨	王玉江	咎丽霞	宗宪春

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学	华中科技大学	云南大学
广西大学	华中师范大学	西北农林科技大学
广州大学	暨南大学	中央民族大学
哈尔滨工业大学	首都师范大学	郑州大学
华东师范大学	南京工业大学	新疆大学
重庆邮电大学	湖北大学	青岛科技大学
滨州学院	湖北第二师范学院	青岛农业大学
河南师范大学	湖北工程学院	青岛农业大学海都学院
嘉兴学院	湖北工业大学	山西农业大学
武汉轻工大学	湖北科技学院	陕西科技大学
长春工业大学	湖北师范学院	陕西理工学院
长治学院	湖南农业大学	上海海洋大学
常熟理工学院	湖南文理学院	塔里木大学
大连大学	华侨大学	唐山师范学院
大连工业大学	华中科技大学武昌分校	天津师范大学
大连海洋大学	淮北师范大学	天津医科大学
大连民族学院	淮阴工学院	西北民族大学
大庆师范学院	黄冈师范学院	西南交通大学
佛山科学技术学院	惠州学院	新乡医学院
阜阳师范学院	吉林农业科技学院	信阳师范学院
广东第二师范学院	集美大学	延安大学
广东石油化工学院	济南大学	盐城工学院
广西师范大学	佳木斯大学	云南农业大学
贵州师范大学	江汉大学文理学院	肇庆学院
哈尔滨师范大学	江苏大学	浙江农林大学
合肥学院	江西科技师范大学	浙江师范大学
河北大学	荆楚理工学院	浙江树人大学
河北经贸大学	军事经济学院	浙江中医药大学
河北科技大学	辽东学院	郑州轻工业学院
河南科技大学	辽宁医学院	中国海洋大学
河南科技学院	聊城大学	中南民族大学
河南农业大学	聊城大学东昌学院	重庆工商大学
菏泽学院	牡丹江师范学院	重庆三峡学院
贺州学院	内蒙古民族大学	重庆文理学院
黑龙江八一农垦大学	仲恺农业工程学院	

前言

现代生命科学的发展在目前乃至今后很长一段时期内,仍将以实验实践为核心。作为现代生命科学的重要分支,细胞生物学的快速发展必须重视实践教学。本教材的编写针对细胞生物学的学科发展特点,综合考虑了不同教学单位的教学资源(师资、场地、设备和经费等)、实验材料来源、教学课时设置等状况,从对实验教学重要性理解、教材选用、教学内容设置等方面综合考量而成。

细胞生物学是生命科学及相关学科知识的交汇点,是生命科学类专业的重要基础课程,处于专业课程体系的核心位置,起到整合生理与生化、分子与细胞乃至个体与群体等多个层面知识的作用,可“串通”和“深化”学习者对生命科学知识的理解。然而,学好细胞生物学课程需要理论与实践的紧密结合。因此,实验课就成为整个细胞生物学教学体系中的一个重要组成部分。通过实验不仅可验证和加深对理论知识的理解,还可培养和提高学生操作与观察能力、分析问题和解决问题的能力以及勇于探索和善于探索的科研素质。因此,细胞生物学实验是非常重要的课程,也是理论课无法替代的课程。

目前,很多人的教学观念仍停留在“实验课是为其理论课服务的,是理论课的补充和延伸”,没有充分地、清楚地认识到实验课的另一个重要功能——培养学生科研素质和创新精神的的教学目标,而这一功能是理论课所不可替代的。因此,我们不仅应当充分认识到实验课能矫正和深化学生对理论知识的理解,服务于理论课,还要坚定地实施培养学生科研素质和创新精神的实践教学目标。实验一方面要辅助和服务于理论课的教学,但由于细胞生物学理论知识是集数百年来多学科研究成果之大成,有限的实验课时不可能涵盖各个经典方面或主题,这就要求在细胞生物学实验教材编写时要有所取舍,选取部分经典和基础性实验,摒弃部分陈旧的内容,根据学科的发展,增加新的实验内容。将部分实验进行整合,增设综合性、探索性实验。巧妙设立保证实现“培养学生科研素质和创新精神的的教学目标”的有效方案和措施,将基础性、综合性、设计性多个层面的实验有机结合起来,使专业知识和技能的传授巧妙且分步骤地实施,设置弹性的多级实践教学目标内容和“可修改性”的综合实验方案或实验方案毛坯,学生根据当地条件稍加改造就可成为一套研究方案的教案。因此,基于这些理解,本教材针对细胞生物学的学科趋势、实验技术发展和使用的普遍性、实践教学的可操作性等特点,共设置7个部分及附录,在各部分同时注重实验项目设置的系统性。

参编人员均为从事细胞生物学教学多年的一线教师,大家也期望力所能及地做些有益的探索和尝试,但毕竟受能力所限,本书难免会有诸多不尽如人意的地方。恳请读者在使用过程中提出改进建议,以使本教材更好地适应细胞生物学的学科发展和创新型生命科学人才培养的需求。

白占涛 李先文

2014年5月

目 录

第 1 部分 显微镜技术 /1

- 1.1 光学显微镜技术 /1
 - 1.1.1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法 /1
 - 1.1.2 特殊显微镜的原理和使用 /7
 - 1.1.3 激光扫描共聚焦显微镜技术 /13
 - 1.1.4 光学显微标本的制作技术 /18
- 1.2 电子显微镜技术 /26
 - 1.2.1 透射电子显微镜 /26
 - 1.2.2 透射电子显微镜样品制备 /29
 - 1.2.3 扫描电子显微镜 /35
 - 1.2.4 扫描电子显微镜样品制备 /39

第 2 部分 细胞亚显微结构的分离和观察 /44

- 2.1 细胞形态结构及显微测量 /44
- 2.2 线粒体和液泡系的活体染色 /45
- 2.3 细胞器的分级分离 /48
- 2.4 细胞器的连续密度梯度离心制备与观察 /49
- 2.5 植物细胞骨架的光学显微镜观察 /52
- 2.6 动物细胞骨架的间接免疫荧光显示 /54
- 2.7 细胞骨架的考马斯亮蓝法观察 /55

第 3 部分 细胞生理学技术 /58

- 3.1 细胞膜的通透性 /58
- 3.2 细胞凝集反应 /60
- 3.3 用荧光脂质进行细胞活体染色 /61
- 3.4 台盼蓝染色法鉴定细胞生死状态 /63
- 3.5 小鼠巨噬细胞吞噬的观察 /65
- 3.6 胞饮作用 /68
- 3.7 细胞膜钠通道的膜片钳记录 /69
- 3.8 细胞计数 /74

第4部分 细胞结构与化学成分的检测技术 /77

- 4.1 DNA的细胞化学——Feulgen反应 /77
- 4.2 RNA的细胞化学——Brachet反应 /79
- 4.3 细胞多糖的PAS反应 /80
- 4.4 细胞中过氧化物酶的显示方法 /82
- 4.5 细胞中酸性磷酸酶的显示方法 /84
- 4.6 细胞中碱性磷酸酶的定位 /86
- 4.7 细胞膜蛋白、细胞浆蛋白和细胞核蛋白及总蛋白的提取 /88
- 4.8 蛋白质的亚细胞定位(GFP报告基因融合法) /93
 - 4.8.1 某动物基因编码蛋白的细胞定位实验 /94
 - 4.8.2 某植物基因编码蛋白的细胞定位实验 /95
- 4.9 植物细胞中碱性蛋白与总蛋白的定位与观察 /97

第5部分 细胞培养与细胞工程技术 /99

- 5.1 植物原生质体的分离、培养与融合 /99
- 5.2 胎鼠肝细胞的原代培养 /101
- 5.3 神经胶质细胞的培养 /105
- 5.4 胎鼠肝细胞的传代培养 /107
- 5.5 细胞融合 /109
- 5.6 细胞的冻存与复苏 /111
- 5.7 细胞转染 /113

第6部分 染色体的观察 /117

- 6.1 Feulgen染色观察有丝分裂 /117
- 6.2 青蛙骨髓细胞染色体标本的制备与观察 /119
- 6.3 人体外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备 /121
- 6.4 人类染色体G带显带技术 /125
- 6.5 染色体核仁组织区的显示 /126

第7部分 细胞重大生命活动的研究 /128

- 7.1 细胞生长、细胞分裂与细胞周期 /128
 - 7.1.1 细胞毒和细胞活力测定 /128
 - 7.1.2 小鼠M期染色体的制备与观察 /133
 - 7.1.3 动物细胞中早熟染色体凝集的诱导和观察 /135
 - 7.1.4 细胞同步化 /137
 - 7.1.5 细胞周期的流式细胞仪检测 /140
- 7.2 细胞分化 /142
 - 7.2.1 植物细胞的脱分化与再分化 /142
 - 7.2.2 血细胞的分化和不同类型血细胞的观察 /144

- 7.3 细胞凋亡 /147
 - 7.3.1 细胞凋亡的形态学观察 /147
 - 7.3.2 细胞凋亡的 DNA ladder 检测 /150
 - 7.3.3 细胞凋亡的流式细胞仪检测 /152
 - 7.3.4 线粒体膜电位检测细胞凋亡 /154

附录 /157

- 附录 A 常用染料及染色剂配制 /157
- 附录 B 常用细胞固定液 /165
- 附录 C 封片剂和粘贴剂 /170
- 附录 D 常用缓冲液的配制 /171
- 附录 E 常用培养基的配制 /179
- 附录 F 器械的清洗与消毒 /187
- 附录 G 光学仪器的保养与清洁 /189
- 附录 H 常用的单位换算 /191
- 附录 I 实验室常用技术参数 /192
- 附录 J 常用实验动物的血液生理生化 /195

参考文献 /204

1.1 光学显微镜技术

光学显微镜技术包括显微镜结构使用以及光学显微镜下观察标本的制作等内容。光学显微镜包括普通光学显微镜和特殊光学显微镜。光学显微镜下观察标本的制作主要是玻片标本制作,包括细胞涂片、印片以及切片标本制作。特殊光学显微镜包括暗视野显微镜、倒置显微镜、相差显微镜、微分干涉显微镜、荧光显微镜、双光子显微镜和激光共焦点扫描显微镜等。本部分主要介绍普通光学显微镜、部分特殊光学显微镜的构造原理与使用,以及光学显微标本的石蜡切片和冰冻切片制作技术。

1.1.1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法

一、实验目的

- (1) 了解普通光学显微镜的原理及构造。
- (2) 熟练掌握普通光学显微镜的使用方法。

二、实验原理

(一) 普通光学显微镜放大原理

普通光学显微镜是实验室观察细胞显微结构的常备工具。普通光学显微镜以可见光(日光或灯光)为光源,通过玻璃透镜将光源汇聚为光束,当光束通过玻片标本时,标本中不同区域对光的滞留时间和吸收波长不同,造成明暗反差和颜色区别,以显示细胞结构细节。

普通光学显微镜成像光束通过的物镜、管镜和目镜等玻璃透镜以及观察者眼睛(晶状体)均为凸透镜,因此其放大原理遵从透镜成像原理,将标本 AB 置于物镜的 2 倍焦距与 1 倍焦距之间,光束经物镜后形成放大的倒立实像 $A'B'$,该实像经过目镜投射到观察者视网膜上,形成一个正立的实像,视网膜接收到的光束好似来自于距离眼睛 250 mm 处再次放大的像,该像实际是不存在的,所以是虚像(即 $A''B''$)。显微镜的放大倍数即为 $A''B''$ 与 AB 高度的比值。普通光学显微镜放大原理如图 1-1 所示。

对任何显微镜来说,最重要的性能参数是分辨率,而不是放大倍数。显微镜的分辨率(D)是指显微镜能够分辨的两个质点之间的最小距离,是显示显微镜解析细胞微细结构能力的重要参数,又称为解析度。 D 值越小,表示显微镜的分辨本领越强。当用普通的中央照明法(使

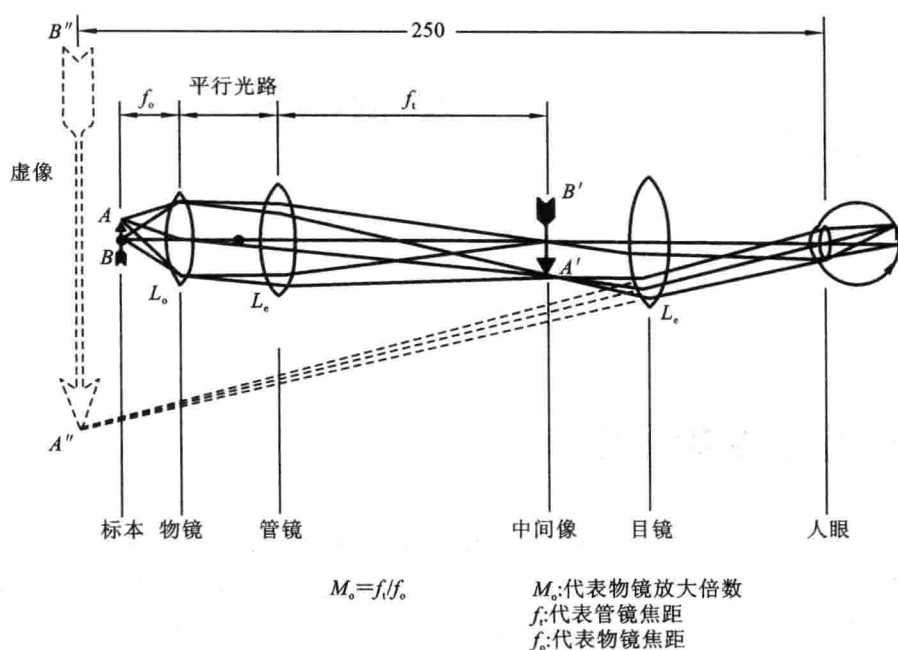


图 1-1 普通光学显微镜放大原理

光线均匀地透过标本的明视照明法)时,显微镜的分辨率取决于光源波长(λ),物镜镜口角 α (标本在光轴的一点对物镜镜口的张角)和介质折射率 N ,它们之间的关系是

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \sin \alpha / 2}$$

其中, $N \sin \alpha / 2$ 称为物镜的数值孔径(NA)。可见光波长范围为400~700 nm,镜口角总是要小于 180° ,所以 $\sin \alpha / 2$ 的最大值必然小于1。当我们选用最高倍数物镜(油浸物镜,简称油镜,即100×物镜,其NA为1.25)时,利用最短波长的可见光为光源,则 $D=195$ nm,即可见光照明的显微镜分辨率的极限值约为200 nm。一般人眼正常的分辨率为0.2 mm,使用光学显微镜可以清楚地分辨细胞的微细结构细节(提高至1000倍),这正是光学显微镜的极限放大倍数,再追求更大倍数也只能是空放大(无效放大),并不能使细节更为清晰。

(二) 普通光学显微镜的基本构造

普通光学显微镜(图1-2)主要由三部分组成,即机械支撑系统、光源照明系统和光学放大系统。

1. 显微镜的机械支撑系统

(1) 镜座:位于显微镜的底部,起支撑和稳固整个显微镜的作用。有的显微镜的镜座内还装有反光镜或光源组件。

(2) 镜柱:位于显微镜镜座上的直立部分,用于连接镜座和镜臂。部分显微镜无此部分。

(3) 镜臂:移动显微镜的把手,起支撑和固定镜筒、载物台及调焦装置的作用。直筒显微镜的镜臂与镜座连接处有活动关节,可按需要将镜臂调节至适当倾斜度。

(4) 镜筒:显微镜上方的空心圆筒,其内喷以无光黑漆(避免光线乱反射),上端套接目镜,下端与物镜转换器连接。镜筒有单筒和双筒两种。单筒又分为直立式和倾斜式两种;双筒都是倾斜式的。双筒镜筒有调距装置,可调节两镜筒之间的宽度,其中的一个镜筒上还装有视度

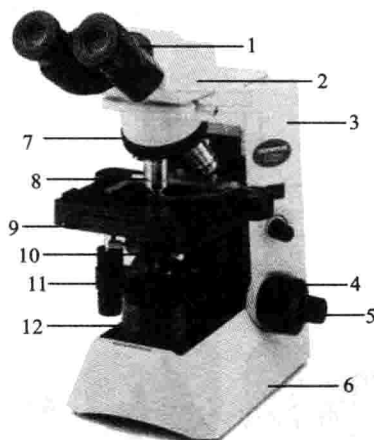


图 1-2 普通光学显微镜结构

1—目镜;2—镜筒;3—镜臂;4—粗调焦螺旋;5—细调焦螺旋;6—镜座;
7—物镜转换器;8—物镜镜头;9—载物台;10—聚光器;11—标本推进器;12—光源

调节装置。镜筒上缘到物镜转换器螺旋下端的距离称为镜筒长度或机械长度。调节式镜筒附有刻度,一般可调范围为 155~250 mm;固定式的为 160 mm 或 170 mm。

(5) 物镜转换器:连接于镜筒的下端,其上有 4~6 个圆孔,可顺序安装不同倍数的物镜。可根据需要转动转换器来更换观察用的物镜。

(6) 载物台:亦称工作台,固定在镜臂上,为方形或圆形,中央有一通光孔,台面上装有推进器和卡片簧夹,可推动和固定标本。有的显微镜在载物台两边或一边(或在推进器上面,或在载物台下面)装有两个移动手轮,转动移动手轮可使载物台前后左右移动,便于观察标本的任一视野。有的显微镜在载物台的纵向和横向上装有游标尺,可测定标本的大小,也可用来对被检视野作标记,以便下次观察时再检查该视野。

(7) 调焦装置:安装在镜臂的两侧,与镜筒或载物台连接。调焦装置包括粗调焦螺旋和细调焦螺旋。转动调焦螺旋可使镜筒或载物台上下移动,以调节焦距,使标本与物镜的距离等于物镜的工作距离。

2. 显微镜的光源照明系统

(1) 照明光源被设置在显微镜底座中的灯室内,为普通钨丝灯或 LED(light emitting diode,发光二极管)灯。对于采用柯勒照明法光源的显微镜,在光源灯与聚光器之间,加放了光源聚光器和视场光阑。

(2) 聚光器由孔径光阑和聚光镜组成,可通过镜臂上的聚光器调节螺旋进行上下方向的调节。孔径光阑位于聚光镜下方,由数个金属薄片依次环形排列组成。通过调节孔径光阑中央的开孔直径,可以调节通过光束的直径。聚光镜位于载物台下方,孔径光阑上方,由单片或数片玻璃透镜组成,有汇聚光线功能,其作用是把通过孔径光阑的光束集中到所要观察的标本上,使透过标本的光线摄入到物镜中。

3. 显微镜的光学放大系统

(1) 目镜安置在镜筒上方,有单目、双目或三目等配置方式。目镜镜头刻印有放大倍数,如“5×”、“10×”,分别表示目镜的放大倍数为 5 倍和 10 倍。

(2) 物镜装置在镜筒下方的物镜转换器上,物镜通常配置 4~6 个。物镜镜头外壳上刻印

有多个符号、数字和缩写标志等,分别表示该物镜的类别、性能参数、使用条件和要求等,如图 1-3 所示。



图 1-3 常见物镜镜头及性能参数

物镜的分类方式主要有两种。

① 根据物镜校正内容不同分类,分为消色差物镜(achromatic objective)、平场物镜(plan achromatic objective)以及平场消色差物镜 3 种基本类型。

色差(chromatic aberration),又称色像差。可见光不是单色光,它是由波长在 400~700 nm 的一系列不同波长的光(即不同颜色的光)组成的复合光,不同波长的光在通过透镜时的折射率不同。这样物方一个点,在像方则可能形成一个模糊色斑。色差一般有位置色差、放大率色差。位置色差使像在任何位置观察都带有色斑或晕环,像模糊不清。而放大率色差则使像带有彩色边缘。另外,在光线通过透镜成像时,由于光学透镜的物理特性,会导致所形成的像出现球差、慧差、像场弯曲(场曲)等像差。

根据需求不同,消除色差的物镜又分为数种:a. 消色差物镜,其标志为“Ach”字样,这类物镜仅能校正轴上点的位置色差(红、蓝两色)和球差(黄绿光)以及消除近轴点慧差。不能校正其他色光的色差和球差,且场曲很大。b. 复消色差物镜(apochromatic objective):其标志为“Apo”字样,透镜采用了特种玻璃,这种物镜不仅能校正红、绿、蓝三色光的色差,同时能校正红、蓝两色光的球差。像差的校正效果较好。c. 半复消色差物镜(semi apochromatic objective):又称氟石物镜(fluorite objective),其标志为“FL”字样,在成像质量上接近于复消色差物镜。

平场物镜是在物镜的透镜系统中增加一块半月形的厚透镜,使显微镜视野中心与边缘能同时准焦,以达到校正场曲的缺陷。平场物镜的视场平坦,更适用于镜检和显微照相。平场物镜常同时具有校正色差功能,常见类型有平场消色差物镜(标志为“PLAN”)、平场复消色差物镜(标志为“PL·APO”或“Plan·Apo”)和平场半消色差物镜(标志为“PL·FL”)等。

② 根据光线在物镜镜头与被检标本之间传播的介质要求不同,分为干燥系物镜和浸没系物镜。干燥系物镜镜头与被检标本之间传播的介质为空气。浸没系物镜镜头与被检标本之间常用的液体为香柏油,物镜镜头金属外壳常用“oil”标志,如 100×物镜。

物镜镜头外壳除了刻印表示物镜像差校正性能的标志外,还刻有放大倍数、数值孔径(numerical aperture, NA)、机械筒长(mechanical tube length)和盖玻片厚度要求等标志。

放大倍数有 4×、10×、20×、40×和 100×等表示方式。

数值孔径有 0.25、0.65 和 1.25 等表示方式。数值孔径常和放大倍数写在一起表示,如 $10\times/0.25$ 、 $40\times/0.65$ 和 $100\times/1.25$,或者表示为 $10/0.25$ 、 $40/0.65$ 和 $100/1.25$ 等形式。

机械筒长是指有限像距的物镜,从其物镜的安装定位处到显微镜镜筒上端面的距离,标准定为 160 mm。对无限远像距的物镜,机械筒长可认为是无限长。在物镜镜筒外壳上分别表示为 160 或 ∞ 。

盖玻片厚度要求常常被刻印在物镜镜筒外壳上,且常和机械筒长写在一起,如 $160/0.17$ 或 $\infty/0.17$,分别表示机械筒长 160 mm/盖玻片厚度 0.17 mm,或机械筒长为无限长/盖玻片厚度 0.17 mm。

三、实验材料、仪器与试剂

普通光学显微镜、擦镜纸、玻片标本(动植物组织切片或细胞涂片)、香柏油、二甲苯或乙醚-乙醇(7:3)混合液等。

四、实验方法与步骤

(一) 照明光路与显微镜光轴的合轴调节

显微镜在设计上存在着一个中心光轴,沿着这个光轴可以使照明灯发出的光束依次经过光源聚光镜、视场光阑、孔径光阑、聚光器透镜均匀地照射到玻片标本上。在使用过程中,由于聚光器位置变化,可能导致物镜视场中光源位置偏向于一侧,不能均匀照明,因此必须通过调节聚光器在水平平面上的位置,使照明光路与显微镜中心光轴完全重合在同一轴线上,这一过程称为光路对中。具体步骤如下。

- (1) 首先选择低倍物镜,转动物镜转换器,当转换器外的金属弹片上的突起滑入到 $10\times$ 物镜头根部外壳上的凹槽内时,物镜即已调节至光路中。
- (2) 将聚光器透镜调升至顶端位置,孔径光阑调至中间位置。
- (3) 打开照明灯电源开关,并逐渐调大亮度。
- (4) 将玻片标本放置于载物台中央,并用推进器的玻片标本夹卡紧。通过调节螺旋调节载物台至适中位置。
- (5) 调节缩小视场光阑,视野中可见边缘模糊的多边形视场光阑图像。
- (6) 缓慢下降聚光器,直至多边形视场光阑图像清晰。
- (7) 同时调节聚光器侧面的 2 个对中旋钮,使视场光阑图像的多边形中心平移,并与视野中心重合,如图 1-4 所示。

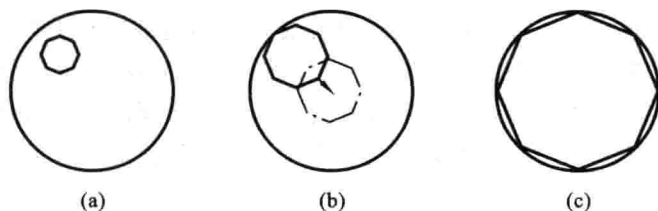


图 1-4 聚光器调中

注:(a)中视场光阑的多边形像偏向左上,由于视场光阑是固定在镜座上的,形成此图像实际上是聚光器偏向右下侧。(b)向左上方调整聚光器,视场光阑的像移向了视野正中。(c)开放视场光阑使之与视场边缘重合。

(8) 逐渐调节放大视场光阑,使其多边形图像成为视野的内节多边形。反复缩放视场光阑,确认对中效果和对中旋钮的松紧稳定。

(9) 进一步调节放大视场光阑,使多边形图像外展扩大,不显现在视野中。

(10) 调节聚光器恢复至顶端位置。

(二) 低倍镜和高倍镜的使用方法

(1) 低倍镜包括 $4\times$ 和 $10\times$ 物镜。使用低倍镜前首先将光源亮度调节适中,光路对中,然后将玻片标本卡紧并调节推进至载物台中央,观察时可适当调节缩小聚光器光圈,提高观察图像的清晰程度。

(2) 高倍镜包括 $20\times$ 和 $40\times$ 物镜。在低倍镜观察清楚的基础上,通过旋转物镜转换器将高倍物镜转入光路中,缓慢调节推进器,更换玻片标本的观察区域,调节孔径光阑和照明光强度至最适状态,谨慎调节粗、细调焦螺旋至图像清晰。

(三) 油镜的使用方法

(1) 高倍镜下将需要进一步放大观察的细胞调节至视野正中央。

(2) 移开高倍镜,然后在观察区域盖玻片表面滴加一滴香柏油,转动油镜镜头,使其浸没于油中,谨慎调节细调焦螺旋至图像清晰。此时一般需要将孔径光阑和照明光强度调节至最大。

(3) 观察结束后,先用专用擦镜纸蘸取少许混合液(乙醚-乙醇,体积比为 $7:3$),将镜头上香柏油擦去,彻底擦净镜头油迹,需要更换擦镜纸,重复上述过程 2 次。然后用干擦镜纸将镜头擦干。盖玻片可用同样方法擦净。

五、实验注意事项

(1) 显微镜要放置在干燥环境中,避免受潮,导致镜头发霉。使用结束后要将显微镜用防尘布包裹并加套防尘罩。

(2) 取放显微镜时必须一只手握住镜臂,另一只手托着显微镜底座,切勿单手斜提镜臂,前后摆动,以防镜头或其他零件掉落。

(3) 擦拭显微镜镜头一般只能利用专用镜头纸或脱脂棉,不能用手指、纱布或卫生纸擦拭,以免磨损镜面。显微镜使用过程中应避免腐蚀性和挥发性溶液或化学试剂接触显微镜,如不慎污染应尽快擦拭干净,以免造成显微镜镜体的锈蚀。

(4) 不要随意拆卸显微镜各部零件,尤其是不要随意取下目镜镜头,以免灰尘或纤维落入镜筒影响观察。

(5) 使用显微镜观察前应首先熟悉调焦螺旋旋转方向与载物台升降的对应关系,以免观察时扭反方向,压碎玻片。放置玻片要注意将有盖玻片的一面向上,同时将要观察的区域放置在载物台中央的光路上。在使用高倍镜时要注意边调节调焦螺旋,边从侧面观察,使物镜镜头尽量与盖玻片接近,然后通过目镜边观察,边调节细调焦螺旋使盖玻片远离物镜镜头。此方法可防止压碎玻片。

(6) 调节焦距过程中,粗、细调焦螺旋要配合使用,不能单方向过度旋转细调焦螺旋,以免损伤细调焦螺旋齿轮。

(7) 显微镜使用结束后,应先将灯光亮度调至最小,然后关掉电源开关,以防止下次打开电源开关时较大电流直接冲击灯丝,影响照明灯泡使用寿命。

六、作业与思考题

- (1) 如何进行显微镜的光路合轴调节?
- (2) 为什么说普通光学显微镜有效放大倍数一般只能达到 1000 倍?
- (3) 使用推进器移动玻片时,显微镜下观察到的图像移动方向与玻片移动方向是否一致?为什么?
- (4) 标记玻片标本中某一组织结构的位置,以便下次观察或示教教学显示,应该如何操作?

(刘忠虎)

1.1.2 特殊显微镜的原理和使用

一、实验目的

- (1) 了解几种特殊显微镜的工作原理及结构。
- (2) 熟悉、掌握相关的几种特殊显微镜的使用方法、适用范围并进行实际操作。

二、实验原理

(一) 暗视野显微镜

在一间光照充足的房间内人们很难看清楚空气中悬浮的尘埃颗粒,但在一间黑暗的房间中如果有一束光线照进房间,则可以清楚看到房间内空气中浮动的尘埃,光线没有直接进入人们眼睛,所以整个视野是黑暗的,能够看到尘埃是由于光线通过尘埃颗粒反射进入了眼睛。暗视野显微镜(dark ground microscope)的基本原理即与这一现象(丁达尔现象, Tyndall phenomenon)一致。暗视野显微镜与普通光学显微镜的区别主要在于聚光器的不同。暗视野显微镜聚光器由特殊聚光镜和孔径光阑构成。其孔径光阑中央为一圆形不透光的薄片材料,称为暗视场光挡,其遮光范围的直径大小应与所用物镜的后焦平面通光孔径相当,光挡直径小于光阑内径,使两者之间形成一个环形的缝隙供照明光线通过。其聚光镜构造特殊,有抛物面型透镜和心形面型结合球面型透镜等特殊形态透镜设计,可使照明光线经其透镜折射和特殊形态表面反射后,形成一空心的光锥,光线沿光锥表面斜向经过玻片标本时,如果没有照射到玻片标本中的细胞或颗粒物则会呈环形射向四周,且避开物镜,形成暗视野。如果照射到玻片标本中的细胞或颗粒物则会发生光的反射或折射,改变光线方向,进入物镜形成图像,如图 1-5 所示。

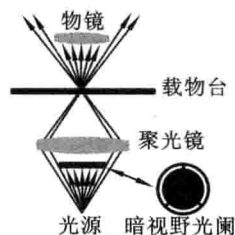


图 1-5 暗视野显微镜的原理

暗视野显微镜主要适用于对细菌颗粒等颗粒型活体样品的观察,在明视野显微镜下观察活体细菌、细胞样品时,由于反差太小,不容易观察清楚,通过暗视野显微镜可以在黑暗背景衬托下观察到活体细菌呈现的亮点,显著增加了反差,其最高分辨率可达 $0.004\ \mu\text{m}$ 。但暗视野显微镜的这个特点也决定了它只能看到物体的大致轮廓,不能显示微细结构。

(二) 相差显微镜

光是电磁波的一种,故又称之为光波。光波传递过程中,具有一定的振幅(亮度)、波长(颜

色)及相位(某一时刻光波传递所达到的位点)。当光波通过物体时,如果物体能够使通过的光波振幅和波长发生变化,则该物体的结构图像就可以被看到。但一般单个活细胞由于其呈现无色透明状,且个体较小,细胞各部微细结构的厚度仅稍有不同,光波通过时颜色和亮度几乎不发生变化,仅相位发生变化,仅发生相位变化而没有明暗反差变化,肉眼不能辨识。为了观察单个活体细胞的结构,荷兰物理学家 Zemike 于 1942 年研制出了第一台相差显微镜(phase contrast microscope)。

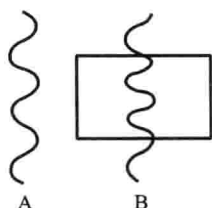


图 1-6 相位差的产生

注:相位相同的光线通过空气(A)和玻璃(B)时因为介质折射系数不同产生了相位差。

显微镜的照明光束由无数相关光线组成,当照明光束通过标本时,部分光线遇到了与光波波长长度相近大小的细胞结构或组分,形成了衍射光,另外一部分光线直接通过细胞结构,仍为直射光,直射光与衍射光穿过标本后发生干涉现象并在像平面上成像。对于染色标本而言,由于标本各点颜色不同和染料附着,对光的吸收差异较大,在像平面上仅直射光线振幅和波长的差异就可形成人眼可辨的像。对于活体细胞,光束通过后形成的直射光线和衍射光线的颜色和亮度几乎不发生变化,但这两类光线出现了相位差别(图 1-6),相差显微镜即是利用光的衍射、干涉原理和巧妙的设计装置,把人眼无法辨识的相位

差变为振幅差,即可辨识的明暗反差。

相差显微镜与普通显微镜有 3 点主要区别。

相差显微镜为环状光阑,普通显微镜的光阑是孔径可调的中空光阑,而相差显微镜的光阑为一个环状孔隙,用于光线通过后形成一环形光源,不同物镜匹配不同的直径和孔隙宽度的光阑。

相差显微镜的物镜加装了相位板,相位板安装在物镜的后焦平面处,相位板有一环状区域,装有吸收光的吸收膜和推迟或提前光相位的相位膜,相位板主要可以使直射光的相位推迟或提前,并使其振幅减小。

相差显微镜增加了用于合轴调节的望远镜,又名合轴调中目镜,主要用于环状光阑(亮环)与相位板环状区域(暗环)调中合轴,环状光阑与相位板环状区域要完全吻合重叠,只有这样才能保证直射光通过相位板后振幅得到减小,相位得到推迟,与衍射光发生干涉后形成有明显反差的像。

相差显微镜的光路如图 1-7 所示,当光线通过标本时形成了直射光和衍射光,衍射光相位较直射光滞后了 $1/4$ 波长,且衍射光振幅远远小于直射光,如果这样的两束光线汇聚后形成干涉光,一般振幅变化不大,在像平面形成的像反差不明显。对于相差显微镜,其环状光阑和相位板调中合轴后,透过环形孔径光阑的环形照明光束,通过标本后如果发生衍射则形成偏转光,而不发生偏转的直射光通过标本后刚好照射在相位板的吸收膜和相位膜的环状区,直射光的振幅减小而与衍射光相当,同时折射光的相位推迟或提前 $1/4$ 波长,经过相位板的直射光与衍射光两者发生干涉就会有较大的振幅变化,形成肉眼可辨识的像。

相差物镜的相位板根据设计不同可分为两种,有的相位板可以使直射光线超前 $1/4$ 波长,直射光通过这种相位板后,直射光就较衍射光共超前了 $1/2$ 波长,直射光和衍射光干涉后,光波振幅减弱,造成像暗而背景明亮,称为正相差,装了这类相位板的物镜称为正相差物镜;反之,如果相位板使直射光线滞后 $1/4$ 波长,直射光与衍射光变为同相位,两者干涉后,光波振幅增强,形成了像亮背景暗的结果,称为负相差,相应的物镜称为负相差物镜。