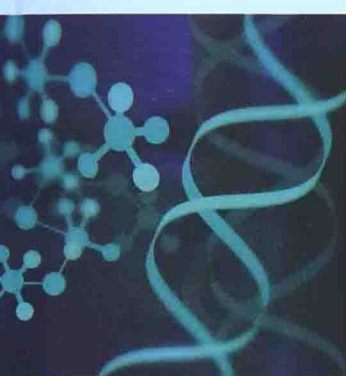


高等医学院校实验教材

供临床医学、麻醉、口腔、预防、中医等专业用



医学细胞生物学 实验指导

主 审 杨康鹃

主 编 张子波 慕明涛

副主编 金艳花 潘智芳



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

高等医学院校实验教材
供临床医学、麻醉、口腔、预防、中医等专业用

医学细胞生物学实验指导

主 审 杨康鹃

主 编 张子波 慕明涛

副主编 金艳花 潘智芳

编 委 (以姓氏笔画为序)

王振华 (青岛大学医学院)

朱金玲 (佳木斯大学医学院)

刘俊俊 (延安大学医学院)

张 静 (延安大学医学院)

张子波 (延边大学医学院)

杨国华 (武汉大学医学院)

杨康鹃 (延边大学医学院)

金 燕 (延边大学医学院)

金艳花 (延边大学医学院)

黄 健 (桂林大学医学院)

慕明涛 (延安大学医学院)

潘智芳 (潍坊医学院)

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/张子波,慕明涛主编.—北京:人民卫生出版社,2014

ISBN 978-7-117-19775-5

I. ①医… II. ①张… ②慕… III. ①医学-细胞生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 214017 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

医学细胞生物学实验指导

主 编: 张子波 慕明涛

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: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 8

字 数: 200 千字

版 次: 2014 年 10 月第 1 版 2014 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-19775-5/R · 19776

定 价: 26.00 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市场营销中心联系退换)

前言

医学细胞生物学是医学教育中的一个重要基础理论学科,是将细胞生物学的理论与技术与医学相结合,并渗透到多个相关研究领域,成为认识生命现象和多种疾病的理论基础,是医学院校学生的一门必修课。医学细胞生物学的每一项新成果都离不开实验,因此,医学细胞生物学实验是该学科的一个重要组成部分和基本环节,在医学理论研究及临床实践中起着非常大的作用,具有重要的现实意义。

编者在积累、总结多年实验教学经验及实验课中经常出现问题的基础上,结合当今医学细胞生物学实验的新方法和新技术,并吸取全国其他院校医学细胞生物学实验指导的优点,注重科学性和实用性的特色,编写出本实验指导。

本实验指导共纳入 22 项实验,设计上分为三个层次:验证、经典实验部分;综合性实验部分;设计、创新实验部分。验证、经典实验部分,即通过一些常规的、经典的基础实验,培养学生掌握医学细胞生物学基本操作技术与技能(如细胞临时标本的制备及基本形态与细胞器的观察,细胞化学成分的显示,细胞有丝分裂及减数分裂标本的制备及观察等);综合性实验部分,即通过综合性实验将一些理论上有关联的实验内容穿插起来进行操作,使学生认识如何将细胞生物学的基本操作和技术分析研究应用于临床医学实践中(如细胞培养技术、细胞融合技术等);设计、创新实验部分,即学生根据自己所掌握的理论、技术及新的细胞生物学发展动态及前沿知识,独立设计新的实验,培养学生的创新意识及设计实验课题的能力(如肿瘤细胞染色体检测和畸变类型分析)。附录中介绍了各项实验中常用试剂的主要成分及详细的配制方法,既可满足学生在实验准备阶段的需要,又可方便学生在综合性和设计性实验中参考。

本教材在编写过程中得到各兄弟院校和同行老师的大力支持与帮助,在此表示最诚挚的谢意!

由于我们的水平和经验有限,加上编写时间仓促,本教材不足之处在所难免。希望广大读者在使用过程中提出宝贵意见,以便于我们在以后的编写工作中不断改进和更新。

延边大学医学院 张子波 杨康鹏

2014 年 6 月

医学细胞生物学实验室规则

医学细胞生物学实验是细胞生物学教学的重要环节及组成部分,而细胞生物学实验室是实验课教学的关键与重要场所。为了使學生能够在一个有序、安全的环境下进行实验,要求师生进入实验室必须严格遵守以下规则:

1. 每次实验前,先预习好该次实验指导,明确实验目的与实验内容。
2. 进入实验室必须穿好洁净的白大衣(隔离服);遵守纪律,保持实验室安静,不许大声喧哗。
3. 实验室内严禁吸烟、吃东西,不准随地吐痰和乱抛杂物,保持实验室干净、整洁,精心爱护实验室内一切公共设施。
4. 对已排定号的座位,配备的显微镜、示教标本、模型或其他实验材料及用品,不得随意挪动及搬运或带出实验室。
5. 实验过程中打碎玻片标本、损坏仪器或仪器出现故障时,要及时举手报告教师,按规定处理。
6. 实验中要注意安全,实验室内电线和插头较多,谨防触电。对强酸、强碱、有毒染料及加热火源要小心使用。
7. 实验室内的精密仪器和贵重设备要妥善爱护,学生不得任意使用,防止使用不当,损坏仪器和设备。
8. 实验过程中,力求节约实验消耗材料、试剂、药品、水、电等。
9. 做完实验后,各自整理好自己使用的实验台,将实验器皿清洗干净,放回原处,并将实验台擦净。
10. 实验中所产生的废物及动物尸体等严禁随意丢弃,应集中放在指定地点按规定处置。
11. 实验结束后,由值日生负责打扫实验室卫生,检查并关好水、电、门、窗等,防止发生意外事故。

目 录

第一篇 验证、经典实验部分	1
实验一 显微镜的类型、结构及使用方法	1
一、显微镜的类型、工作原理及应用范围	1
二、普通光学显微镜的结构和使用方法	2
三、电子显微镜的类型、工作原理和电镜样品的制备技术	6
实验二 细胞的基本形态观察	10
一、平滑肌细胞的观察	10
二、神经细胞的观察	10
三、血细胞的观察	11
实验三 细胞器的观察	12
一、高尔基复合体的观察	12
二、线粒体活体染色标本制备及观察	13
三、中心体的观察	14
四、细胞骨架的制备及观察	14
实验四 游标卡尺的使用及细胞的显微测量	17
一、游标卡尺的使用方法	17
二、细胞的显微测量方法	18
实验五 几种动植物细胞临时标本的制备	20
一、人体口腔颊部黏膜上皮细胞临时标本的制备和观察	20
二、洋葱表皮细胞临时标本的制备和观察	21
三、X 染色质标本制备及其观察(离心法和直接涂片)	22
实验六 蟾蜍的解剖及各器官系统的观察	25
实验七 蟾蜍的纤毛运动及骨骼肌细胞的观察	30
一、蟾蜍的纤毛运动标本制备及观察	30
二、骨骼肌细胞的剥离与观察	31
实验八 液泡系活体染色及观察	32
实验九 细胞化学成分的显示	33
一、DNA 和 RNA 的显示	33
二、细胞内碱性蛋白和酸性蛋白的显示	34
三、细胞内碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的显示	35
四、过氧化氢酶的显示	37

实验十 动植物细胞有丝分裂标本观察	40
一、动物细胞有丝分裂标本——马蛔虫受精卵子宫切片显微镜下观察	40
二、植物细胞有丝分裂标本的观察——洋葱根尖切片标本的观察	41
实验十一 动植物细胞有丝分裂标本的制备	43
一、小鼠骨髓细胞染色体标本的制备及观察	43
二、植物细胞有丝分裂的标本制备及观察	44
实验十二 小鼠精巢细胞减数分裂标本的制备	46
实验十三 细胞组分的分离与鉴定	49
实验十四 细胞生理功能性实验	51
一、细胞活性的鉴定——酵母菌	51
二、细胞的吞噬活动	51
三、细胞膜的通透性	52
第二篇 综合性实验部分	55
实验十五 动物细胞的原代培养	55
实验十六 动物细胞的传代培养	59
实验十七 干细胞培养技术	72
实验十八 人外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备技术	77
实验十九 细胞凋亡技术	86
实验二十 细胞融合技术	94
实验二十一 流式细胞术及应用	96
第三篇 设计、创新实验部分	101
实验二十二 肿瘤细胞染色体检测 and 畸变类型分析	101
附录	103
附录一 细胞生物学实验动物的解剖常识	103
附录二 实验报告书的绘图要求及书写注意事项	106
附录三 各项实验所需试剂配制	108
主要参考文献	120

第一篇 验证、经典实验部分

实验一

显微镜的类型、结构及使用方法

一、显微镜的类型、工作原理及应用范围

1. 普通光学显微镜(光镜) 光镜是利用光线照明将微小物体形成放大影像的仪器,是最常用的显微镜。显微镜或人眼在 25cm 的明视距离处,能清楚地分辨被观察物体细微结构最小间隔的能力称为分辨力。人眼的分辨力约为 $100\mu\text{m}$,光镜的分辨力为 $0.2\mu\text{m}$ 。

2. 荧光显微镜 荧光显微镜是利用一定波长的光(通常是波长短的紫外光和蓝紫光)照射被检标本,激发标本内物质发出可见的荧光。通过物镜和目镜的放大成像,视野中呈现出荧光映像。细胞内大部分物质经紫外光等短光波照射后,可发出较弱的荧光;有些物质需经荧光染料染色后才能发出荧光,进而对组织进行细胞化学的观察和研究。激发滤片和阻挡滤片是荧光显微镜的主要部件。激发滤片可吸收可见光,产生单色光源;阻挡滤片可阻断或吸收光路中的激发光或某些波长较短的光线,起到保护眼睛的作用。

3. 暗视野显微镜 暗视野显微镜可用普通光镜改装而成,其聚光器底部的中央有一块遮光板,使进入反光镜的中央光不能直射入物镜,而仅允许光线从聚光器斜向照明被检标本,再经标本反射进入物镜成像。使用时应注意物镜的数值孔径必须小于聚光器的数值孔径,否则会破坏或降低暗视场的照明。这种显微镜能比较方便地观察活体的细胞或微小生物的运动情况,但不能分辨清楚其内部微细结构。

4. 倒置显微镜 倒置显微镜的物镜位于标本的下方,而光源位于标本的上方,即物镜、聚光镜和光源的位置都颠倒过来。其主要用于无色透明的活体观察及细胞培养时观察培养瓶中的细胞生长情况。

5. 相差显微镜 一般生活细胞在普通光学显微镜下不能分辨其细微结构,这是由于各部微细结构的折光性很近或对比不够显著的缘故。相差显微镜借助环状光阑和相位板两个部件的作用,将相位差转变为人眼睛可分辨的振幅差(明暗差)。光线经过透镜会聚成束,发生互相叠加或抵消的干涉现象,使原来透明的活体表现出肉眼明显可见的明暗区别。相差显微镜能够比较清楚地观察到活细胞及活细胞内的某些细微结构甚至对细胞核、线粒体等细胞器的动态研究,而无须对细胞进行固定和染色等处理。

6. 共聚焦显微镜 共聚焦显微镜系统由倒置荧光显微镜、激光器、扫描头、系统控制塔、电脑及显示器组成。共聚焦显微镜与传统显微镜原理的差异是照明方式不同,传统显微镜是一次性照明整个视野中的样品,因此可以用眼睛直接观察或者用 CCD 获取图像,没有时间延迟;而共聚焦显微镜是逐点成像,无法用眼睛成像,也无法用 CCD 获取图像,只能用探测器收集每个像素点的信号,再通过软件重构图像,有一定的时间延迟。另外,共聚焦显微镜在探测器前放置一个 pinhole 小孔,用来阻止非焦面的信号,同时通过焦面的信号,以消除焦点模糊。正是因为 pinhole 小孔的存在,共聚焦显微镜具有了光切能力,能对厚样品进

行三维层切成像。共聚焦显微镜的功能是可以消除焦点模糊,得到清晰的图像。用作高精度荧光显微镜,可获取三维图像和多荧光标记图像。时间序列扫描成像,可对样品进行长时间的动态观察,获取样品不同时间的图像。虽然共聚焦显微镜能获取比普通显微镜更清晰的图片,但共聚焦显微镜存在它本身的局限性,实际上共聚焦显微镜的分辨率只比普通光学显微镜有少量的提高,普通光学显微镜的分辨率理论极限大约是 $0.2\mu\text{m}$,共聚焦显微镜的分辨率理论极限大约是 $0.15\mu\text{m}$ 。共聚焦显微镜的一大限制是成像速度较慢,这限制了其用来研究生物领域中的一些快的实验。

7. 双筒解剖显微镜 解剖较小标本或观察玻片标本的全貌时,需要使用解剖显微镜,以观察自然状态的较小的实验和较大的玻片标本或解剖细小生物。

8. 电子显微镜 与上述光学显微镜不同的是用电子束代替了光源。但电子像不能用肉眼看到,一般用摄影机摄影或用荧光屏显示。其特点是分辨率高,一般光学显微镜最高位为1500倍或1700倍,而电子显微镜可达20 000倍,最高可达80 000倍以上。

一般生物本身是不存在有色物质,在观察前必须固定和染色,除非有些着色的动物细胞和植物细胞中含有叶绿素的叶绿体,不用着色就可以观察。为此,选择适合研究标准的显微镜也是非常重要的。如观察固定和染色的标本一般选择明视野显微镜,即普通光学显微镜;如果需要增强活体标本对比度,应选择相差显微镜、暗视野显微镜、倒置显微镜和荧光显微镜等。

二、普通光学显微镜的结构和使用方法

【实验目的】

初步掌握普通光学显微镜的主要结构及功能;掌握低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。

【实验用品】

材料:组织切片、字母装片;器材:普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、擦镜纸、吸水纸、二甲苯、香柏油。

【实验原理】

光学显微镜简称光镜,是一种可以让标本产生放大图像的仪器,无论研究活的或固定的细胞结构及其生物进程,光学显微镜都是一种不可替代的技术。目镜和物镜是显微镜放大系统的关键部件,其两者乘积就是显微镜放大倍数。而放大标本的可见度主要取决于对比度和分辨率。对比度就是观察的样本中物体与背景间光密度差异。

光镜是根据光学原理,采用一组玻璃透镜制作而成。外部光线经反光镜反射入聚光镜,聚光镜将光线会聚在被观察的标本上,照亮标本,便于观察。当光线透射标本进入物镜后,物镜将标本作第一次放大,形成一个倒立的实像。光线再经过目镜进入人眼,目镜将第一次放大的实像作第二次放大,此时便在人的视野中得到一个放大的倒立虚像,成为显微镜的观察图像。

【实验方法】

1. 光镜(双筒显微镜)的基本结构与功能 不同型号或不同厂家制造的光镜外形和结

构可能有较大的差异,但其基本结构和工作原理相似。普通的双筒光学显微镜在构造上主要包括机械系统和光学系统两部分(图 1-1)。



图 1-1 普通光学显微镜(双筒)结构示意图

(1) 机械系统

镜座:为显微镜的底座,可以支撑和稳定显微镜的整体结构。在镜座内装有照明装置。

镜柱:连接镜臂与镜座的垂直短柱。

镜臂:镜柱上方的弓状部分,握拿显微镜的部位,其连接并支持镜筒。

镜筒:在光镜的最上方的圆筒状结构,其上端为目镜的安装部位,下端与物镜转换器相连。镜筒可有单个或两个,依此光镜可分为单筒式和双筒式两类。

物镜转换器:为一凸形圆盘状结构,位于镜筒下方,其上分布有 3~4 个镜孔,可安装不同放大倍数的物镜。通过转动物镜转换器换用不同的物镜,注意一定要将物镜转换器边缘上的缺刻和基座上的“T”形卡相扣合,使物镜与光轴合轴,否则无法观察标本。

调焦螺旋:也称升降调节器、调焦器,为调节焦距的装置,在镜柱的两侧各有一对大小不等的重合螺旋,分为粗调螺旋和细调螺旋。粗调螺旋可使载物台(或直立式镜筒)较快速度升降,一般在低倍镜观察标本时使用;细调螺旋只能使载物台缓慢移动,适用于高倍镜和油镜下观察及低倍镜的精细调焦,使视野中标本更为清晰,也常用于对标本不同层次的观察。在左或右粗调螺旋的内侧靠近镜柱处有一窄环,称为粗调螺旋松紧调节轮,转动该轮可调节粗调螺旋的松紧度。另外,在粗调螺旋的内侧还有一短柄,将该柄向前推紧,可使粗调螺旋限位,载物台不能再上升,但细调螺旋仍可调节。

载物台:也称平台,是位于物镜下方且与镜柱垂直相连的方形台,为被观察的玻片标本放置处。其中央有一透光孔,光线经此孔照亮标本。

标本移动器:也称移片器,连接在载物台上方,可移动玻片标本,其上的弹簧夹可固定玻

片标本。

(2) 光学系统

目镜:套在镜筒的上端,常见的有 $5\times$ 、 $10\times$ 或 $15\times$ 的目镜,数字表明目镜的放大倍数为5倍、10倍或15倍。目镜通常由两片(组)透镜组成,一般在上下透镜之间的镜筒上粘有一小段细铜丝或头发作为指标,用以指明视野中的被观察标本的位置。目镜放大倍数过大,反而会影响观察效果。

物镜:是决定显微镜成像质量和分辨能力的重要部件,其安装在物镜转换器上。根据物镜放大倍数的不同可分为低倍镜、高倍镜和油镜三种。其上刻有 $4\times$ 或 $10\times$ 为低倍镜, $40\times$ 为高倍镜, $100\times$ 为油镜(还常标有“油”或“oil”字样)。从外形上看,各物镜的长短不同,一般是越短的放大率越低,越长的放大率越高,油镜最长,高倍镜次之,低倍镜最短。每个物镜上都刻有相应的主要性能参数,如 $10/0.25$ 、 $160/0.17$,表示该物镜的放大倍数为10,数值孔径为0.25,160为160mm的镜筒长度,0.17为所需盖玻片的厚度为0.17mm,如果盖玻片厚度超过0.17mm,就不能看清楚标本。

聚光器:位于载物台透光孔下方,由聚光镜和光圈组成,可使光线集中到所要观察的标本上,增加视野亮度。在聚光器的左方有一调节螺旋可使其上升或下降,上升聚光器可使光线增强,反之则光线减弱。聚光镜由一组透镜组成,具有会聚光线的作用,把光线会聚放大,射向被观察的标本,进入物镜。

光阑:也称虹彩光阑或孔径光阑,位于聚光镜的下方,由一组金属薄片组合而成,外侧有一小柄,可使光圈的孔径变大或缩小,以改变外来光束的直径,调节进光量。光圈开大则光线较强,适于观察颜色深的物体;光圈缩小则光线较弱,适于观察透明或无色的物体。光圈的下方常装有一滤光片圆环,可放置各种颜色的滤光片。

2. 光镜的使用方法 使用显微镜时,首先用右手握住镜臂轻轻从镜箱取出显微镜,左手托住镜座,缓慢地放在实验台的中偏左侧,以镜座后端离实验台边缘约3~5cm为宜。

(1) 低倍镜的使用

1) 准备与调光:将显微镜电源线插在合适的接地电源插座上,将光源开关拨到“ON”的位置,调节光亮控制钮,获得适当的照明亮度。当光源在使用时,指示灯绿灯持续发亮。转动粗调螺旋,使载物台下降。再转动物镜转换器使低倍镜对准透光孔,当听到轻微扣碰声时,表示镜头到位,目镜与物镜的光轴一致。将光圈完全打开,升高聚光器至载物台同高(或略低)。

2) 放置玻片标本:将玻片置载物台上(有盖玻片或标签的一面朝上),用标本移动器上的弹簧夹夹住标本玻片并固定好。然后转动标本推进器的螺旋,使所观察的标本部位移向透光孔中央。

3) 调节焦距(调焦):侧面观察,用粗调螺旋上升载物台,至镜头距玻片约0.5cm处,然后用左眼向目境内观察,同时慢慢转动粗调螺旋使载物台下降,直至视野中出现物像,再用细调螺旋调至物像清晰为止。使用粗调节器时,不可持续不断地向上或向下旋转,以免压碎标本或损坏显微镜。然后移动玻片,观察标本的各部位。如果第一次失败,必须严格按上述步骤从头开始。

双目显微镜调焦步骤:

首先要调节观察者本人的双目瞳间距:用两只手抓住观察镜面板,调节目镜筒间距,直到通过两目镜筒同时看到完整的视场。瞳距不对,操作时容易感到疲劳,并影响物镜齐焦。

调到适当位置时,注意读出双目间距刻度值,将右目镜筒刻度圈旋到与双目间距相同读值,闭上左眼或用不透明物遮盖左眼,用微调手轮仔细调焦显微镜,直到标本对右眼清晰成像,说明右目镜调好。再闭上右眼,不需调焦,旋转左目镜筒刻度圈,直到标本对左眼清晰成像。如果目镜瞳距和刻度圈已调节适合,将得到的最佳效果是:①注意无论看到任何标本,用粗微调手轮调焦,左右眼都能看到同样清晰成像;②观察者头部在确定位置通过两目镜可舒适地看到整个视场;③将转换器上的物镜换到另一个物镜时,需要稍微调手轮,便可获得清晰图像。如果未得到上述结果,应重新调节。为了避免每次使用显微镜都要重复这些调节,应记住本人已调好的各刻度值。

4)玻片标本与光阑的调节:直接用手指或利用标本推进器将玻片前后左右移动。注意:如玻片向前移动,则物象后退,如玻片向左移动,则物象向右行,反复练习可使动作随心所欲,将光阑慢慢缩小或开大,找出最适合的光度。可以发现,最强的光度不一定是最适合的光度。再缓缓调节细调焦器,就会发现不同的焦距可以观察到标本的不同层次的结构。

(2) 高倍镜的使用

1)依照上述操作程序,先在低倍镜下找到需观察的物像,将其移至视野中央,同时调节焦距,使物像清晰。

2)从侧面观察注意物镜,转动物镜转换器,使高倍镜对准透光孔,调节光圈或聚光器使光亮度适宜。

3)用双眼从目镜上观察,慢慢上下转动细调螺旋便可使物像清晰。一般高倍镜下不再使用粗调螺旋,以防止镜头触及玻片标本而损坏镜头。如需观察新标本,应先转开物镜,下降载物台,取出标本,再放置新玻片,然后重复上述步骤,直到物象清晰为止。如按上述操作找不到物象时,可能有如下原因:观察的目的物不在视野之内,可换回低倍镜,将目的物移至视野中央;玻片放反了,如果是盖玻片的标本,将有盖玻片面朝上,再按上述操作;标本太少或太稀少,在高倍镜下找准后移至视野正中央,再转高倍镜观察;标本浅或透明,光太强,应调节聚光器或光阑,减少进光。

当物像清晰时,物镜镜面与标本之间的距离,称为工作距离。物镜放大倍数越高,工作距离越短,反之亦然。根据物镜的工作距离,确定每个物镜的高度,不同倍数的物镜基本处于同一焦面上。因此低倍镜成像后再换高倍镜或油镜,都应见到物像,或用细调节器稍微调节即可,这称为同高度焦。但有的物镜不配套或质量差,低倍镜找到物像后,调换高倍镜往往转不过来或碰擦标本,此时不能硬转,可将镜筒略升高,直接用高倍镜调焦。更换标本时,先转开物镜,再取出或放置标本。若用高倍镜观察仍不清晰,或放大倍数不够时,需要用油镜观察。

(3) 油镜的使用方法

1)在高倍镜下找到需观察的标本,将其移至视野中央。转开高倍镜,在玻片透光孔中央位置处滴一滴香柏油或液状石蜡,然后转动物镜转换器使油镜转至工作状态,此时,油镜镜面与油滴接触或浸在油滴中。也可先下降载物台,将油镜对准透光孔,然后侧面观察,用粗调螺旋缓慢上升载物台,使油镜下端浸入油滴。特别注意不能使油镜压在标本上,更不能用力过猛。注意用油镜时载物台不能倾斜。

2)用双眼观察目镜,缓慢转动细调螺旋直至视野中物像清晰为止。必要时可开大光圈或升高聚光器以增加镜内的视野亮度。

使用完油镜,应立即降低载物台,把油镜转向一侧,用干擦镜纸把镜头上的油擦一次,再

用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹,最后再用干擦镜纸擦干净。有盖玻片的标本,同样用擦镜纸或少许二甲苯将盖玻片上的油擦干净,无盖玻片的标本不能擦,以免损坏标本。

(4) 低倍镜、高倍镜和油镜的使用练习

1) 字母装片的观察:先用眼睛观察装片字母的位置,将有字母的位置对准透光孔,按上述操作方法,先低倍镜,再转到高倍镜观察。

2) 毛发交叉装片的观察:严格按照上述操作方法,先在低倍镜下找到毛发交叉点,将交叉点移到视野中央,再转换高倍镜观察。

3) 血涂片的观察:血涂片一般用瑞氏染料染成蓝紫色,因此只需将有蓝紫色的位置对准透光孔,先在低倍镜下找到细胞,换到高倍镜观察,再用油镜观察。

(5) 使用显微镜的注意事项:显微镜是一种精密的仪器,必须正确使用和维护。

1) 取用显微镜时,应轻拿轻放,一手握镜臂,一手托住镜座,切勿一只手斜提,以避免目镜和其他零部件滑落。

2) 显微镜不可放置在实验台边缘,以免碰翻落地。

3) 使用前要检查,如发现缺损或操作时损坏,应立即报告指导教师。

4) 放置玻片标本时,应将盖玻片的一面向上,否则使用高倍镜或油镜时找不到物像,同时又易损坏玻片标本和镜头。临时制片要加盖玻片,由于含有水分,易于流动,镜台需平放。

5) 不得随意取出目镜,以免灰尘落入镜内影响观察,显微镜的其他零部件也不可随意拆卸,以免丢失或损坏。

6) 使用显微镜时,应养成正确的操作习惯,观察时应两眼同睁、双手并用,反复多次练习,做到能够一边观察,一边计数或绘图记录。

7) 维护显微镜的清洁,机械部分如有灰尘、污物等可用纱布擦净,光学部件只能用擦镜纸轻轻向一个方向擦拭,不可用纱布、手帕或普通纸揩擦,以免损坏镜头。

8) 显微镜使用完毕后应及时复原。先下降载物台,取下玻片,使物镜转离透光孔,下降聚光器,然后放回镜箱。

三、电子显微镜的类型、工作原理和电镜样品的制备技术

电子显微镜(electron microscope),简称电镜,是使用电子来展示物件的内部或表面的显微镜。

高速的电子的波长比可见光的波长短(波粒二象性),而显微镜的分辨率受其使用的波长的限制,因此电子显微镜的分辨率(约0.1nm)远高于光学显微镜的分辨率(约200nm)。

1. 电子显微镜类型 电镜主要有两种类型:透射式电镜和扫描式电镜。

(1) 透射式电镜:透射式电镜以高速电子束作为光源,通过电磁透镜使被检物体放大成像。其成像主要利用电子的散射和干涉作用。当电子束中的电子与被检物体的原子核和核外轨道上的电子发生碰撞后会引发散射和干涉现象,从而使得透过物体的电子数目多少及电子相位产生变化,在荧光屏上会呈现出亮暗区,即观察到物体的电镜像。透射式电镜可用于观察细胞超微结构、细菌、病毒及化学组分等。

(2) 扫描式电镜:电子枪发射出的电子在加速电压作用下形成高速电子流,电子流经电磁透镜作用形成极细的电子束,电子束在样品的表面逐点、逐行扫描,入射电子碰撞被检样

品中原子的核外电子后,核外电子获得能量脱离原子成为二次电子。由于样品表面形貌不同,致使二次电子信号电流强弱发生变化,在荧光屏上呈现一幅放大的立体感很强的图像。扫描式电镜主要用于观察样品表面的立体结构或断面结构。进行观察时只需固定、脱水、干燥等处理,而不需对样品切片,也不受样品厚度的影响。

2. 电子显微镜的组成 电子显微镜的主要组成部分是:

电子源:是一个释放自由电子的阴极,一个环状的阳极加速电子。阴极和阳极之间的电压差必须非常高,一般在数千伏到 300 万伏之间。

电子透镜:用来聚焦电子,一般使用的是磁透镜,有时也使用静电透镜。电子透镜的作用与光学显微镜中的光学透镜的作用是一样的。光学透镜的焦点是固定的,而电子透镜的焦点可以被调节,因此电子显微镜不像光学显微镜那样有可以移动的透镜系统。

真空装置:真空装置用以保障显微镜内的真空状态,这样电子在其路径上不会被吸收或偏向。

样品架:样品可以稳定地放在样本架上。此外还有可以用来改变样品(如移动、转动、加热、降温、拉长等)的装置。

探测器:用来收集电子的信号或次级信号。

3. 电子显微镜的工作原理和结构简介 显微镜的两大要素是照明源和透镜,两者缺一不可。光学显微镜是以可见光作为照明源,采用玻璃透镜。而电子显微镜是利用高压加速电子束为照明源,轴对称电磁场为透镜,特称电磁透镜。都是依赖透镜放大成像,这一基本原理是相同的。由于照明源的不同,光镜与电镜的成像原理有本质区别。前者的成像过程是样品对可见光的反射和吸收,整个过程总是在大气中。电子显微镜则是在高真空系统中,快速电子照射样品时,入射电子要与样品物质中的原子结构发生碰撞作用,原子核与核外层电子都会对入射电子有碰撞引起的散射,导致部分电子的运动方向和能量变化。样品中不同结构不同区域致密度不同,散射程度也不尽相同,所以穿过样品的初射束是不均匀的电子束,束内电子密度各处互有差异,当其投射到荧光屏上就会形成描绘结构信息的可见光强度反差图像。因此,电子显微镜的成像机制是散射。

运动电子在磁场中,要改变运动轨迹,磁场强度的变化可以控制电子运动方向偏转角度的大小。轴对称电磁场对电子束的偏转作用相当于玻璃透镜对可见光的作用,具有聚焦、放大成像的功能。形成轴对称电磁场的实体,是被磁屏蔽铁壳包裹起来的通电线圈,线圈内侧开一狭窄口,狭口处装上对称性非常好的高导磁材料精加工制成的磁极,通称为“极靴”。线圈上通过电流时,就会在极靴间隙产生轴对称电磁场。

电磁透镜的焦距取决于如下因素:

$$f \propto (S + D) \frac{U}{(NI)^2}$$

(1) 无论励磁电流的方向如何,安匝数 $(NI)^2$ 总使得焦距 f 是正值,所以电磁透镜恒为会聚透镜。

(2) 透镜极靴间隙 S 和内孔径 D 愈小,焦距 f 愈短,则电磁透镜的放大倍率就愈大。

(3) 透镜轴向磁场强度 $H_z \propto NI$, 则 $f \propto (S + D) \frac{1}{H_z^2}$ 。所以电磁透镜的轴向 H_z 愈强,焦距 f 愈短。只要调节励磁电流 I , 即可以连续改变透镜的放大倍率,操作简便。

(4) $f \propto U$, 即表明电子束的加速电压 U 的波动会引起焦距的变化,因此要力求加速电压

十分稳定。

现代透射电镜包括:电子光学系统、真空系统、电气系统、水冷却循环系统和压缩空气系统等。

显微镜主体是电子光学系统,简称镜筒。考虑到机械稳定性,真空度易保性,电镜镜筒都制成直立式的,自下而上由一个个电磁透镜垒起来。

镜筒的完整构造,包括以下四大部分:

(1) 照明系统

电子枪——发射电子并加速电子束,是以阴极、栅极和阳极三极管式组成。

第一聚光镜——控制电子束束斑直径大小。

第二聚光镜——控制电子束强度,改变照明的强弱程度。

此系统的调节用于获得良好的照明束。

(2) 样品室

样品移动机械装置——移动样品选择视场。

测角台——侧插式进样气锁装置,并用于控制样品与电子束的倾斜角。

(3) 成像放大系统

物镜——形成第一幅高分辨图像的透镜,物镜电流的变化主要用来聚集图像。

中间镜——控制图像的放大倍率,调节中间镜电流可连续改变放大倍数。

投影镜——它将最终放大图像投射到观察室荧光屏。

(4) 观察记录系统

观察室——由铅玻璃窗围成的观察室内,装有将电子像转换成可见光反差的荧光屏。

照相装置——随时可把需要的图像拍照记录下来。

电镜正常运行时,整个电子光学系统保证在高真空状态,观察者依靠电气调节操作观察。

4. 电镜样品制备技术和方法 在透射电镜生物样品的制备技术中,超薄切片技术是最重要最基本的一种。目前应用的冷冻切片技术、电镜细胞化学技术、电镜放射自显影技术等都是以超薄切片技术为基础。“超薄切片”是指使用超薄切片机切割样品,保证厚度在 $0.1\mu\text{m}$ (100nm)以下的切片,最好为60nm左右。这样的超薄片才能保证电子束透过样品传递结构信息。良好的超薄切片,应该是薄而均匀,没有皱褶、刀痕、震颤等缺陷,尤其在制作过程的各个环节,要力求细胞微细结构保存良好,无人为假象,染色要适当,避免沉淀与污染且具有良好的反衬度。

超薄切片的制作步骤包括:

(1)取材:从生活状态下的生物体中取得所需材料。为尽可能保持原生活状态的组织结构,必须操作准确、迅速,取样体积小、防损伤。

(2)固定:迅速终结细胞活性的过程谓之固定,因此取材后要立即进行固定处理。常用方法是化学固定法,固定液有钨酸、醛类、高锰酸钾等。

(3)脱水:这一步骤是把组织细胞中的游离水去掉,因为水分的存在会使组织结构在电镜高真空状态下急剧收缩而遭破坏。另外目前多用非水溶性包埋剂,细胞游离水会影响包埋剂的浸透,所以脱水是重要的步骤。常规“梯度脱水法”按30%→50%→70%→80%→95%→100%逐级加大脱水剂的浓度,逐步把水分置换出来。脱水剂有乙醇、丙酮、甲醇、乙二醇等。

(4)包埋:用包埋剂取代脱水后的组织块中的脱水剂,并制成适于超薄切片机易切割的固体块。好的包埋块才能切出高质量的连续切片。常用的包埋剂有进口的 Epon812、国产的 618 等。

(5)切片:目前国内采用的超薄切片机是瑞典产的 LKBⅢ、Ⅳ、Ⅴ型和 NOV_a 型,它们是利用样品臂金属杆热胀冷缩的微小长度变化进行切片。超薄切片的整个过程为修块、制刀、切片、捞片等步骤。

(6)染色:将捞到支持铜网上的切片进行电子染色。单染法:只用一种染液染色,大多是用铅染色,效果较好,有些情况为了避免铅的干扰,则单独使用铀染色。双染法:先用醋酸铀染色,而后再用柠檬酸铅染色,这是目前普遍采用的方法,染色效果较好。染完色的超薄切片,用蒸馏水反复冲洗,除去多余的染色液,待干燥后,即可镜检。

5. 样品的观察、识别和分析

(1)学习侧插式样品支架的使用方法,按仪器操作说明书实际操作演示,并将准备好的超薄切片铜网放入支架上。

(2)给电镜进样、启动高压获得照明。假如电子光学系统已经对中调好状态,那就用样品移动杆选择观察视场,调节中间镜电流到适当的放大倍数。配合调节第二聚光镜选择合适的亮度,开始观察分析荧光屏上的结构图像。

(3)预先选择准备好的动物或植物样品切片供观察分析。

例一:鼠小肠上皮细胞切片

首先在低放大倍数(5000 倍左右)下对一个铜网孔的切片进行普查。可看到上皮细胞形状规则,排列整齐,细胞间接触紧密。随着放大倍数增高,可看到上皮细胞的连接由微绒毛、微原纤维向内伸延,20 000 倍的视场内可见上皮细胞的紧密连接,中间连接和桥粒构成的细胞间的复合连结体。

例二:鼠肝细胞超薄切片

观察内容:细胞核(双层核膜、核孔、核仁)、粗面内质网(囊状膜上附着核糖体)、光面内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体等。

例三:玉米叶片的超薄切片

在低放大倍数(5000 倍左右)下,观察叶肉细胞,可见完整细胞并易找到叶绿体部位。将此部位移到视场中心,提高放大倍数到 30 000 倍就可看到维管束鞘中的叶绿体,不重叠排列的类囊体。

(4)电镜照片参观:根据电镜实验室的特色,挑选一批动植物、微生物和病毒等方面的典型电镜照片,让同学学习各种细胞器的超微结构特征。

【作业与思考题】

1. 绘出光镜结构示意图并注明各部分的名称。
2. 简述光学显微镜的使用方法。
3. 为什么用高倍镜或油镜时,必须从低倍镜开始?
4. 目镜在显微镜的成像上起何作用? 如何判断视野中所观察到的污点是在目镜上?
5. 如果在高倍镜下未找到你所看到的物像,应从哪些方面找原因,以求解决?

细胞的基本形态观察

一切生物体都是由细胞构成,细胞是生物形态、结构及功能的基本单位,细胞的形状具有多样性,但每种细胞的形状一般是固定的,细胞形状的维持靠细胞骨架的作用和受相邻细胞或细胞外基质的制约,并与细胞生理功能有关。不论细胞的形态如何,细胞的结构一般分为3大部分:细胞膜、细胞质和细胞核。所有需观察的细胞都应放置到无色透明的载玻片上制备成临时或永久玻片标本后,才适于在光镜下观察,大多数情况下还需在细胞或组织上加盖一张盖玻片,以起到保护标本和显微镜镜头等作用。

一、平滑肌细胞的观察

【实验目的】

了解光镜下平滑肌细胞的基本形态结构

【实验用品】

材料:平滑肌切片标本;器材:光学显微镜。

【结果分析】

将平滑肌纵切片置低倍镜下,可见分散单个或重叠在一起的平滑肌纤维即平滑肌细胞,呈粉红色或蓝色。将清晰完整的单个细胞移至视野中央,换高倍镜观察,可见肌细胞为细长梭形,细胞中央有一个椭圆形细胞核(图 2-1)。



图 2-1 平滑肌细胞

二、神经细胞的观察

【实验目的】

了解光镜下运动神经元细胞的基本形态结构。

【实验用品】

材料:运动神经元切片标本;器材:光学显微镜。

【结果分析】

将脊髓前角运动神经元切片置低倍镜下观察,可见染成蓝色的大三角形、星形细胞即为