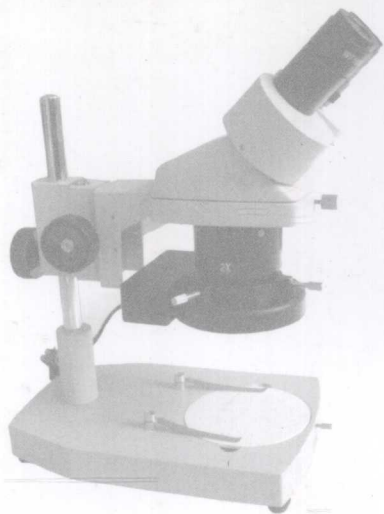
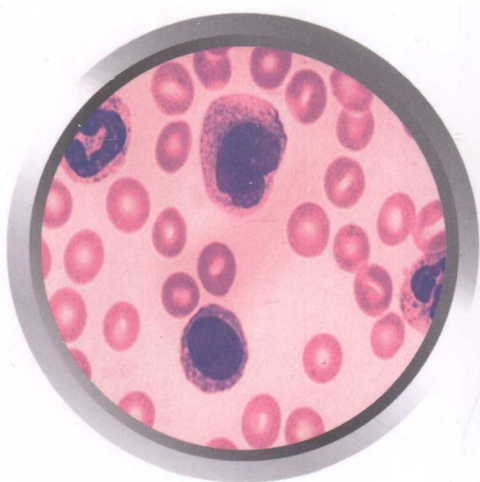




总主审 高培福

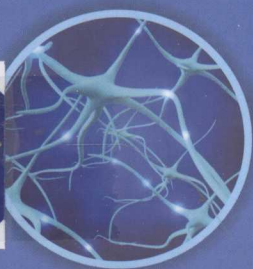
总主编 张 杰

供临床医学、护理学、药学等专业使用



基础医学显微 形态学实验教程 (上册)

刘霞 李伟 李帅 主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



供临床医学、护理学、药学等专业使用

基础医学显微 形态学实验教程 (上册)

总主审 高培福

总主编 张 杰

主 编 刘 霞 李 伟 李 帅

副主编 崔春红 周道清 李泰东

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 凯 王巧珍 王申涛 刘 霞

李 帅 李 伟 李泰东 张 杰

张琳琳 周道清 姜 鹤 高淑萍

崔春红 隋鹏诺



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书分为三篇,内容包括常用仪器及基本实验方法、经典验证性实验及综合性实验。

本书在教学内容上,比以往的实验教程更加丰富、深刻、新颖,旨在提高学生的临床科学思维能力、学习能力,以及正确观察、分析和辨别事物的能力,同时在编写内容上也具有一定的前瞻性和灵活性,以适应不同院校、学制、专业学生的需要。在教学方法和手段上,比以往的实验教程更加灵活、生动、实践性强,力求激发学生的学习兴趣、学习主动性和提高学生的动手能力。通过以上教学内容、教学方法、教学手段的改革,力求达到培养适应社会发展的应用型、创新型人才的目的。

本书适合高等医药院校临床医学、护理、药学及医学检验等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

基础医学显微形态学实验教程(上册)/刘 霞 李 伟 李 帅 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.7
ISBN 978-7-5609-8957-0

I. 基… II. ①刘… ②李… ③李… III. 人体形态学-显微术-实验-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 102702 号

基础医学显微形态学实验教程(上册)

刘 霞 李 伟 李 帅 主编

策划编辑:陈 鹏

责任编辑:罗 伟 熊 彦

封面设计:范翠璇

责任校对:朱 玢

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:湖北新华印务有限公司

开 本:880mm×1230mm 1/16

印 张:16.25

字 数:536千字

版 次:2013年7月第1版第1次印刷

定 价:58.00元



华中出版

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

总序

高等医学教育的目标是培养医学理论基础扎实、实践能力强、富有创新精神和高尚品格的高素质医学应用人才。在高素质医学应用人才的培养过程中,基础医学实验教学是其中重要环节之一,它不仅培养学生的实验技能,而且也培养学生的创新能力和严谨的科学态度,使学生的知识结构、思维能力、实践能力和创新能力全面协调发展。

基础医学教育改革的主要目标之一是改变传统的以教师为中心的教学模式,构建一种既能体现教师的指导作用又能充分发挥学生自主学习作用的新型教学模式,并在此基础上实现实验教学内容体系、教学手段及教学方法的全面改革。传统的形态学实验教学基本上是以学科为中心的教学模式,使人体系统的完整知识被分割隶属于不同的学科和课程,实验教学基本上依附于理论教学,多为重复性、验证性实验。而且由于授课时间先后的不同,使形态学课程之间存在的必然的内在联系不易在同一时段有效体现,造成了前期课程和后续课程的衔接不良、知识体系的脉络分割等弊端。因此,建立新的形态学科实验教学模式,在整体教学设计上,全面整合和优化教学内容,打破学科界线,密切基础教学与临床教学之间以及形态学科间的相互联系,创建以学生为主体的教学环境,围绕自主学习进行改革十分必要。

本系列实验教材涉及组织与胚胎学、病理学、细胞生物学、遗传学、医学微生物学、医学寄生虫学等多门课程,淡化了原有的学科界限而强调内容的系统性、完整性和实用性。既有经典的验证性实验,也有综合性实验,内容上的创新表现于文字简明扼要、图文并茂,实用性表现于实验项目中设置了相关的临床病例及讨论,对培养学生独立思考、分析问题、解决问题的能力,提高学生的自主学习能力,进一步密切医学基础课程与临床课程间的联系,建立完整的医学科学体系将起到较好的推动作用。

本系列实验教材的编写将进一步促进高等医学院校实验教学的改革、探索和研究。本教材既具有一定的创新性和前瞻性,又具有很好的实用价值和参考价值,对培养高素质“技能型”、“应用型”人才将发挥积极的作用。



原山东医科大学校长

山东省高等医学教育研究中心主任

2013年4月于济南

前言

“基础医学显微形态学实验”包括组织胚胎学和病理学两门学科实验课程。组织胚胎学是研究正常人体的微细结构及其相关功能的学科,主要研究方法是显微镜观察。病理学是研究疾病的发生、发展、结局、机制和规律,进而阐明疾病本质的医学基础学科,主要研究方法是显微镜观察和病理大体标本观察。

基础医学显微形态学实验要求学生在光学显微镜下仔细观察切片中的内容,辨别各种组织和细胞的正常形态结构,了解各种组织、细胞的超微结构,同时识别发生病理改变的器官、组织的异常形态结构,并能准确绘制出组织学形态结构图。

结合专业培养目标、教学改革要求、学生实际情况,在以往实验指导的基础上,参考大量实验教学方面的教材和资料,从而编写了此本《基础医学显微形态学实验教程(上册)》。此书在教学内容上,比以往的实验教程更加丰富、深刻、新颖,旨在提高学生的临床科学思维能力、学习能力,以及正确观察、分析和辨别事物的能力。同时在编写内容上也具有一定的前瞻性和灵活性,以适应不同院校、学制、专业学生的需要。在教学方法和手段上,比以往的实验教程更加灵活、生动、实践性强,力求激发学生的学习兴趣、学习主动性和提高学生的动手能力。通过以上教学内容、教学方法、教学手段的改革,力求达到培养适应社会发展的应用型、创新型人才的目的。

《基础医学显微形态学实验教程(上册)》在章节安排上与教材同步。本书在全体编者的共同努力下完成,经过了反复讨论和修改,以求精益求精。同时也得到相关学校领导及同行的大力支持和帮助,在此向他们表示诚挚的感谢。

由于编者水平有限,错漏之处在所难免,恳请各位读者、同行、学生在阅读本实验教程时提出宝贵意见,以便再版时修订和改进。

编者

2013年4月

目 录

第一篇 常用仪器及基本实验方法

第一章 显微镜的结构和使用	/ 3
第一节 普通光学显微镜的结构和使用	/ 3
第二节 荧光显微镜的结构和使用	/ 7
第三节 倒置相差显微镜的结构和使用	/ 9
第二章 基本实验方法	/ 12
第一节 病理大体标本制作技术	/ 12
第二节 组织切片制作与 HE 染色技术	/ 13
第三节 组织(细胞)化学技术	/ 16
第四节 免疫组织化学技术	/ 18
第五节 原位杂交技术及其应用	/ 21
第六节 显微测量与显微切割技术	/ 24
第七节 常用电镜技术及标本的制备	/ 28

第二篇 经典验证性实验

第三章 组织学与胚胎学	/ 41
第一节 上皮组织	/ 41
第二节 结缔组织	/ 45
第三节 软骨和骨	/ 46
第四节 血液和血细胞的发生	/ 49
第五节 肌组织	/ 51
第六节 神经组织	/ 53
第七节 神经系统的组织结构	/ 56
第八节 皮肤的组织结构	/ 58
第九节 循环系统的组织结构	/ 60
第十节 内分泌系统的组织结构	/ 63
第十一节 免疫系统的组织结构	/ 67
第十二节 消化管的组织结构	/ 70
第十三节 消化腺的组织结构	/ 75
第十四节 呼吸系统的组织结构	/ 78
第十五节 泌尿系统的组织结构	/ 81
第十六节 男性生殖系统的组织结构	/ 83
第十七节 女性生殖系统的组织结构	/ 86
第十八节 眼与耳的组织结构	/ 89
第十九节 人胚胎的早期发育	/ 91
第二十节 颜面的发生	/ 93
第二十一节 消化系统和呼吸系统的发生	/ 94

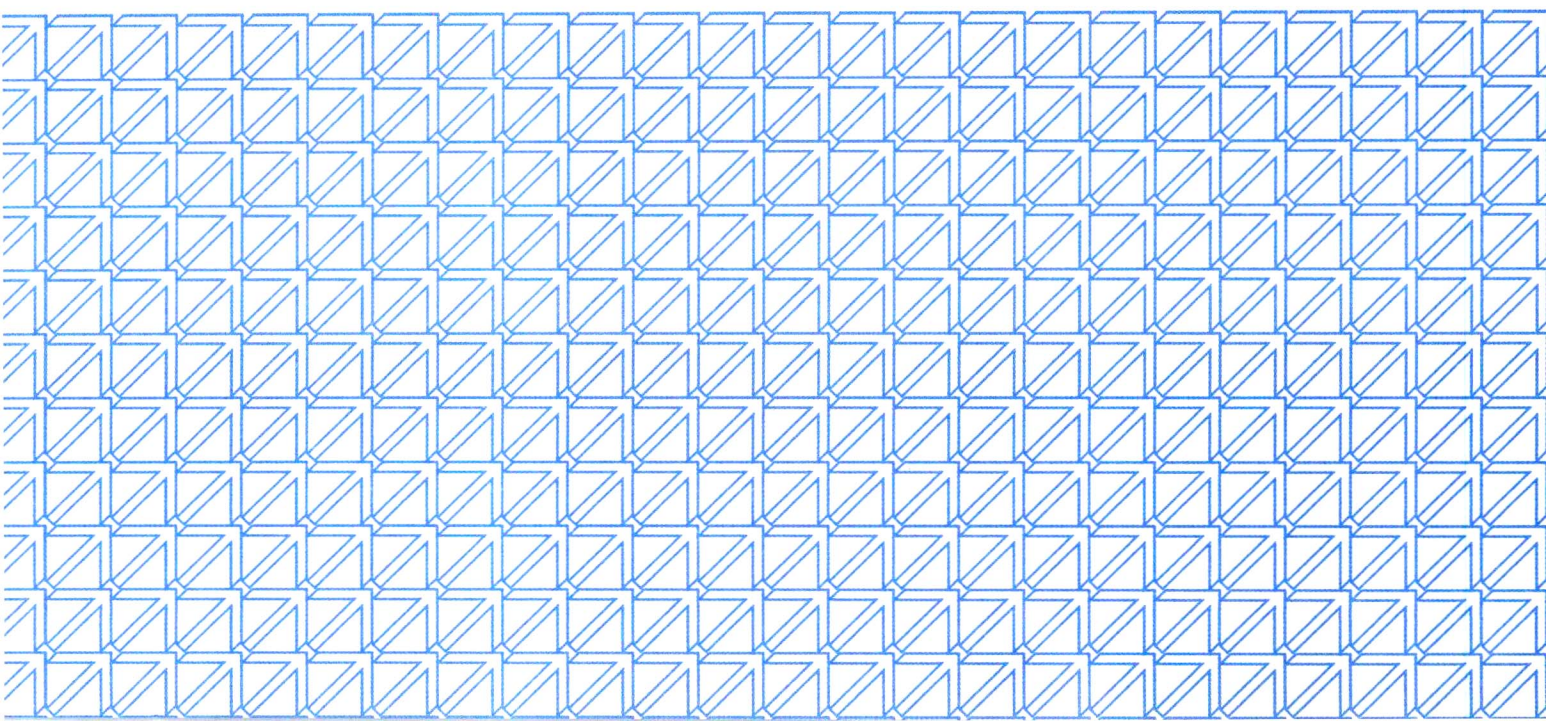


第二十二节 泌尿系统和生殖系统的发生	/ 95
第二十三节 心血管系统的发生	/ 96
第四章 病理学	/ 98
第一节 病理学实验常识	/ 98
第二节 细胞、组织的适应与损伤	/ 101
第三节 损伤的修复	/ 119
第四节 局部血液循环障碍	/ 121
第五节 炎症	/ 128
第六节 肿瘤	/ 137
第七节 心血管系统疾病	/ 155
第八节 呼吸系统疾病	/ 163
第九节 消化系统疾病	/ 171
第十节 淋巴造血系统疾病	/ 178
第十一节 泌尿系统疾病	/ 182
第十二节 生殖系统和乳腺疾病	/ 190
第十三节 内分泌系统疾病	/ 202
第十四节 神经系统疾病	/ 210
第十五节 传染病	/ 215
第十六节 寄生虫病	/ 224
第三篇 综合性实验	
第五章 形态学定量分析	/ 233
第一节 肿瘤组织细胞的显微图像分析	/ 233
第二节 肿瘤微血管构筑异质性与正常组织微血管形态学观察	/ 234
第六章 动物实验	/ 236
第一节 血液循环与空气栓塞	/ 236
第二节 肾脏血管分布特点与肾缺血性梗死	/ 237
第三节 病原微生物的感染与炎症的发生	/ 238
第四节 胃黏膜屏障结构与胃溃疡	/ 238
第五节 肿瘤肺转移动物模型的建立及观察	/ 240
第六节 脂肪肝模型的建立及观察	/ 240
第七章 疾病分析与诊断	/ 242
第一节 非肿瘤性疾病	/ 242
第二节 肿瘤性疾病	/ 246
附录	/ 249
附录 A 成人正常脏器参考数据	/ 249
附录 B 常用临床化验参考数值	/ 250
主要参考文献	/ 253

第一篇

常用仪器及基本 实验方法

Changyong Yiqi Ji Jiben Shiyan Fangfa



第一章

显微镜的结构和使用

显微镜是人类伟大的发明。它的问世把人们带入一个全新的微观世界,透过显微镜人们看到了许多肉眼看不见的小的“动物”和“植物”。从显微镜的发明至今,显微技术发展突飞猛进,尤其是过去的一个世纪,显微镜质量有了很大的提高,各种新型的显微镜相继问世,比如荧光显微镜、倒置相差显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、电子显微镜及数码显微摄像系统,为医学及其他领域的发展提供了强大的技术支持。

第一节 普通光学显微镜的结构和使用

普通光学显微镜是利用光学原理,把人眼不能分辨的微小物体放大成像,供人们观察其形态与结构的光学仪器,它广泛应用于科学研究的各个领域。

一、实验目的

- (1) 熟悉普通光学显微镜的结构和成像原理。
- (2) 掌握普通光学显微镜的使用及日常养护方法。

二、实验材料

光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、标本片。

三、实验内容

(一) 光学显微镜的成像原理

显微镜和放大镜起着同样的作用,就是使近处的微小物体形成一放大的像,以供人眼观察。只是显微镜比放大镜具有更高的放大率而已。把物镜 L_1 和目镜 L_2 均以单块透镜表示,物体 AB 位于物镜的 2 倍焦距和 1 倍焦距之间。所以,它经物镜以后,必然形成一个倒立的放大的实像 $A'B'$; $A'B'$ 位于目镜的 1 倍焦距以内,再经目镜放大为虚像 $A''B''$ 后供眼睛观察。从图上可以看出虚像 $A''B''$ 比眼睛直接看到的 AB 大得多,所以我们用显微镜可以看清非常微小的物体,所不同的只是眼睛通过目镜所看到的不是物体本身,而是物体被目镜、物镜放大了两次的倒立的像(图 1-1-1)。

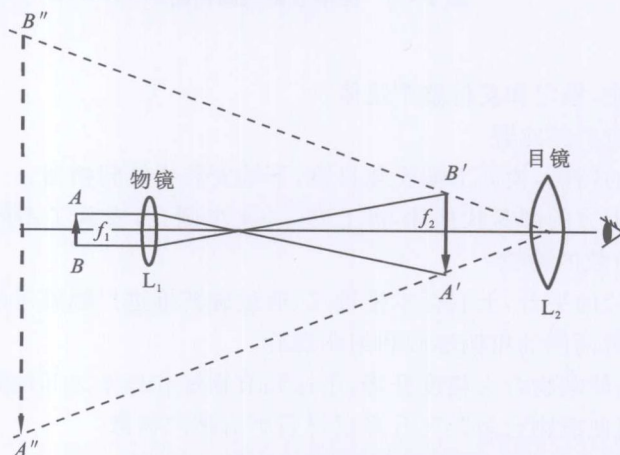


图 1-1-1 显微镜成像原理图



(二) 油镜的使用原理

由于油镜的透镜孔径非常小,光线经过存在于标本玻片和镜头之间的空气的折射作用之后射入油镜的光线很少,视野很暗,物像不清晰。在镜头和玻片(玻璃折光率 $n=1.5150$)之间滴加香柏油(香柏油折光率 n 为 $1.5148\sim 1.5152$),因为香柏油的折光率与玻璃的折光率接近,所以可大大降低空气的折射作用,使进入油镜的光线增多,观察视野的亮度增加,呈现出清晰的物像,见图 1-1-2。

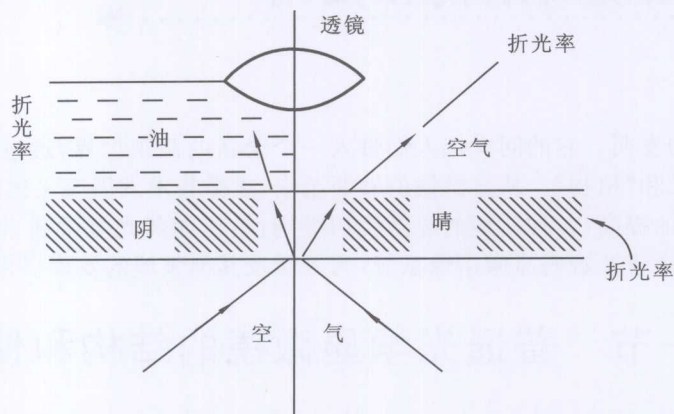


图 1-1-2 油镜原理图

(三) 光学显微镜的结构

普通光学显微镜由三部分组成:机械部分、照明部分和光学部分(图 1-1-3)。

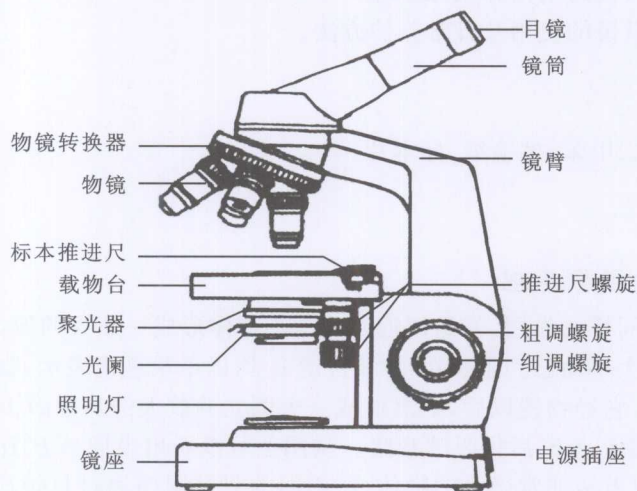


图 1-1-3 光学显微镜结构图

1. 机械部分

(1) 镜座:显微镜的底座,稳定和支持整个镜体。

(2) 镜臂:取放显微镜时手握此臂。

(3) 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。

(4) 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,转动物镜转换器可更换不同放大倍数的物镜。

(5) 载物台:放置标本片的平台,上有标本推进尺,通过旋转推进尺螺旋可前后左右移动标本片。

(6) 调焦装置:装在镜臂两侧的粗调螺旋和细调螺旋。

① 粗调螺旋:转动时可使载物台大幅度升降,迅速调节物镜和标本之间的距离使物像出现在视野中。

② 细调螺旋:转动时可使载物台短距离升降以得到更清晰的物像。

2. 照明部分 照明部分安装在载物台下方,包括反光镜、聚光器、光阑。

(1) 反光镜:安装在镜座上的平、凹两面镜,可任意方向转动,将光线射到聚光器。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。电光源显微镜一般在镜座内安装有照明装置,光线的强弱由底座上的亮度调节钮控制。

(2) 聚光器: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的强弱。

(3) 光阑:在聚光镜的下方,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,上刻有 5×、10×或 15×,表示放大倍数。一般用 10×。

(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:放大倍数和数值孔径(也称镜口率),如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.25;镜筒长度和所要求的盖玻片厚度,如 160/0.17。不同放大倍数物镜的技术参数见表 1-1-1。

表 1-1-1 不同放大倍数物镜的比较

镜 头	放 大 倍 数	镜 身	数 值 孔 径	工作距离/mm
低倍镜	10	短	0.3	7
高倍镜	40	较长	0.5	0.5
油镜	100	长	1.3	0.2

① 数值孔径(numerical aperture, NA)是物镜的主要技术参数,是判断其性能高低的重要标志。其数值的大小反映该物镜分辨率的大小,数值越大分辨率越高。

② 分辨率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,分辨率越高。人眼的分辨率可达 0.1 mm,显微镜的分辨率能达到 0.2 μm。

分辨率与数值孔径的关系:

$$R=0.61\lambda/NA$$

$$NA=n \cdot \sin(\alpha/2)$$

式中, R 为分辨率, λ 为光波波长, NA 为数值孔径, n 为介质折射率, α 为透镜的孔径角。

③ 工作距离是指显微镜处于工作状态(物像调节清晰)时物镜前透镜的表面到被检标本之间的距离。平时习惯所说的调焦,实际上是调节工作距离。物镜的放大倍数越大,工作距离越小。不同放大倍数物镜的工作距离见图 1-1-4。

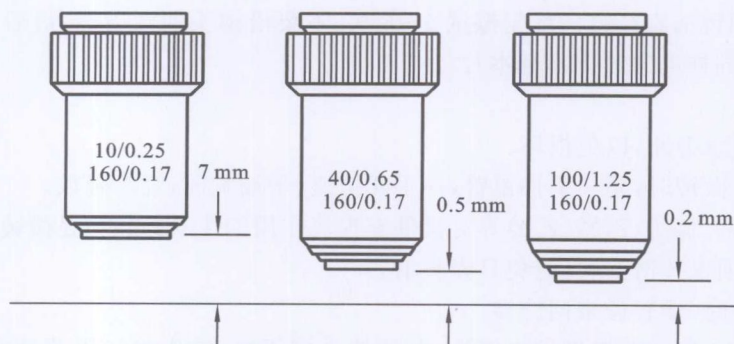


图 1-1-4 不同放大倍数物镜的工作距离

④ 分辨率和放大倍数对成像的影响:显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。分辨率和放大倍数是两个不同的但又互有联系的概念。当选用的物镜数值孔径不够大,即分辨率不够高时,显微镜不能分清物体的微细结构,此时即使过度地增大放大倍率,得到的也只能是一个轮廓虽大但细节不清的图像。反之,如果分辨率已满足要求而放大倍数不足,则显微镜虽已具备分辨的能力,但因图像太小而仍然不能被人眼清晰看见。显微镜的分辨率是由物镜的数值孔径决定的,目镜只是起放大作用。因此,对于物镜不能分辨出的结构,目镜放得再大,也仍然不能分辨出。



(四) 光学显微镜的使用步骤与日常养护

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置:取显微镜时,右手握镜臂,左手托镜座,将其轻放在操作者略偏左侧,显微镜应离实验台边缘至少一拳的距离。

(2) 对光:转动粗调螺旋,使载物台与物镜距离拉开,转动物镜转换器,使低倍镜对准通光孔,打开光阑,上升聚光器,将反光镜凹面对准光源,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均匀。若使用电光源显微镜,首先打开电源开关,然后使低倍镜对准通光孔,开大光阑,上升聚光器使视野明亮均匀。

(3) 放置标本片:取标本片,盖玻片面朝上放在载物台上,旋转标本推进尺螺旋移动标本推进尺将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头,同时慢慢转动粗调螺旋,使载物台上升至物镜距标本片约5 mm处,然后一边在目镜上观察,一边缓慢转动粗调螺旋使载物台缓慢下降至视野中出现清晰的物像。

如果看不到物像,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粗调螺旋转动得太快,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,可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物镜头,慢慢地转动转换器使高倍物镜镜头对准通光孔。

(3) 调节焦距:向目镜内观察,一般能见到一个模糊的物像,稍稍调节细调螺旋,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阑。

3. 油镜的使用方法

(1) 选好目标:必须先在低倍镜、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,在玻片标本观察部位滴一滴香柏油,然后从侧面注视着镜头与玻片,转动镜头转换器使油镜头浸入油中。

(3) 调焦:一边观察目镜,一边稍稍调节细调螺旋,使物像清晰。如目标不理想或不出现物像,需要重找,在加油区内重找应按低倍镜至油镜程序,以免玷污高倍镜头。

(4) 擦净油镜头和标本片:转动粗调螺旋下降载物台,将油镜头旋出,先用擦镜纸擦去香柏油,再用擦镜纸蘸取少许二甲苯顺镜头直径方向反复擦拭5~6次,不要沿镜头的圆周擦,最后用干净的擦镜纸把残留的二甲苯擦掉,再以同样的方法擦净标本片。

4. 显微镜的维护

(1) 显微镜不得随意拆卸,以免损坏。

(2) 取、送、搬迁显微镜时,要一手持镜臂,一手托镜座,平端胸前,轻拿轻放。

(3) 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、乙醇等对机件有损坏作用的化学药品与显微镜接触。

(4) 光学部分,必须保持清洁,且避免日光直射。

(5) 使用细调螺旋时,要轻微来回旋转。

(6) 油镜使用后应立即用擦镜纸拭去镜油,若油迹未擦干净,应先将二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头,再用干净擦镜纸擦去镜头上残留的二甲苯。低倍镜头、高倍镜头可用软绸布擦拭,不能用硬布(纸)擦拭。

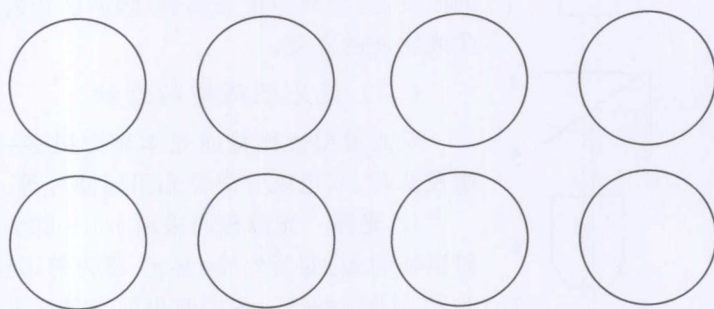
注意:二甲苯应尽量少用,以免渗入油镜内溶解用以粘固透镜的胶质,造成透镜移位或脱落。

(7) 显微镜镜头擦净后,各物镜头转成“八”字形,降低载物台与聚光器。用软绸布拭净各部件后,套好外罩,放入镜箱内或送至显微镜室。

四、实验讨论及作业

(1) 简述光学显微镜的结构。

(2) 绘制镜下观察到的细菌的形态和染色结果。



张 杰

第二节 荧光显微镜的结构和使用

荧光显微镜是以高压汞灯为光源,照射被检物使之发出荧光,然后在镜下观察物体的形状及所在位置。荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本工具,主要用于血清中自身抗体的检测、组织中免疫球蛋白及补体组分的检测、微生物的快速鉴定、激素和酶的组织定位等。

一、实验目的

熟悉荧光显微镜的结构和使用方法。

二、实验材料

荧光显微镜、人口腔黏膜上皮细胞临时制片、洁净载玻片、盖玻片、眼科镊子、吸水纸、95%乙醇、0.01%吖啶橙染液。

三、实验内容

(一) 荧光显微镜的使用原理

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,当其从激发态再恢复到基态时,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。各种荧光分子有其特定的吸收光谱和发射光谱(荧光光谱),即在某一特定波长处有最大吸收峰和最大发射峰,因此要观察不同的荧光应选用不同波长的激发光,得到的荧光强度才能最大。

2. 荧光显微镜的原理 荧光显微镜采用高压汞灯作为光源。汞灯由石英玻璃制成,中间呈球形,内充一定数量的汞。工作时由两个电极间放电,引起汞蒸发,球内气压迅速升高,当汞完全蒸发时,可达5~7 MPa,这一过程一般需5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使汞分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果,它发射紫外光到红光各色光,其中强紫外光和蓝紫光等短波长光足以激发各类荧光物质。

光源发出的光经过激发滤片后,选择性地透过可使标本产生荧光的特定波长的短波长激发光,同时阻挡对激发荧光没有用的光,短波长激发光激发标本内的荧光物质发射出荧光,通过物镜和目镜放大,同时目镜前的阻断滤片阻挡掉没有被标本吸收的激发光,有选择地透过荧光,从而使观察者通过目镜可观察到清晰的荧光。

目前常用的落射式荧光显微镜的光路图见图1-2-1。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,反射的激发光被双色束分离器阻挡,少量

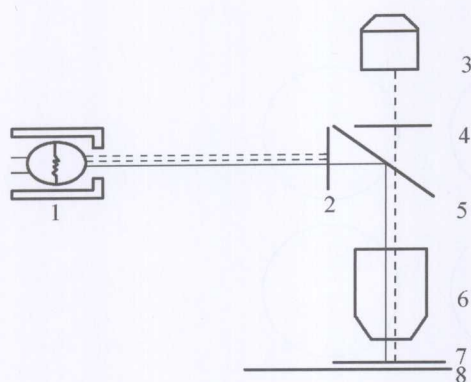


图 1-2-1 落射式荧光显微镜光路图

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

通过双色束分离器的激发光再被阻断滤片吸收。如换用不同的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的组合插块,可满足不同荧光物质的需要。

(二) 荧光显微镜的结构

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 光源普遍采用 100~200 W 超高压汞灯,它能发射很强的光,如紫外光、蓝光、绿光等,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。

一般有紫外光、紫蓝光、蓝光和绿光激发滤片,各自提供一定波长范围的激发光。

U 组:紫外光激发滤片,激发波长 330~400 nm

V 组:紫蓝光激发滤片,激发波长 395~415 nm。

B 组:蓝光激发滤片,激发波长 400~490 nm。

G 组:绿光激发滤片,激发波长 510~550 nm。

(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;二是选择并透过特异的荧光,表现出专一的荧光色彩。阻断滤片常与激发滤片相对应,组合使用。

3. 聚光镜 专为荧光显微镜设计制作的聚光镜是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成,主要有明视野聚光镜和暗视野聚光镜两种。

(1) 明视野聚光镜:在一般荧光显微镜上多用明视野聚光镜,它具有聚光力强、使用方便等特点,特别适用于低、中倍放大的标本观察。

(2) 暗视野聚光镜:暗视野聚光镜在荧光显微镜中的应用日益广泛,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,观察舒适,可发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

4. 双色束分离器 与光轴成 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到待检观察部位,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。物镜上有标记,如 40/1.0(GLYC)是指放大 40×、镜口率 1.0、需用镜油的物镜。

7. 目镜 一般有 5×目镜和 6.3×目镜。

(三) 荧光显微镜的使用方法与注意事项

1. 荧光显微镜的使用方法

(1) 启动高压汞灯:打开电源开关,当电压稳定在 220 V 或指示灯变亮后按启动键,高压汞灯被点燃,一般预热 10 min 后,汞灯达到最亮点方可观察。

(2) 调中光源:应按照使用的荧光显微镜说明书进行操作,最终是通过调节汞灯调中钮使灯影光斑和反射影光斑在载物台的投射平面上居中且重合。光源调中后,显微镜不再移动,以后使用时直接放置标本片观察即可。

(3) 放置标本片:载玻片厚度应在 0.8~1.2 mm 之间,太厚的玻片,一方面光吸收多,另一方面不能使激发光在标本上聚集。载玻片必须光洁,厚度均匀,无明显自发荧光。

(4) 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。

(5) 关闭普通光源,针对所观察的荧光,选择合适的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,调节细调螺旋可得到清晰的荧光图像。用油镜观察时,必须用无荧光的特殊镜油或无荧光甘油。

2. 荧光显微镜练习使用 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 5 min,然后晾干,滴加 0.01%吖啶橙染液染色 2 min,用 PBS(配制方法见附录)漂洗,保留一滴 PBS,加盖玻片临时封固,选用紫外激发滤片在荧光显微镜上观察。

3. 注意事项

(1) 点燃高压汞灯后不可立即关闭,以免灯内汞蒸发不完全而损坏电极,一般需要等 15 min 后方可关闭。

(2) 高压汞灯关闭后不能立即重新打开,必须经 15 min 汞灯冷却后才能重新再启动,否则会影响汞灯寿命。

(3) 荧光几乎都较弱,应在较暗的室内进行。

(4) 高压汞灯可散发大量热能,因此灯室必须有良好的散热条件,工作环境温度不宜过高。

(5) 防止紫外线对眼睛的损害,观察过程应戴上防护眼镜。

(6) 由于荧光衰减或淬灭,避免长时间在荧光下观察同一部位,暂时不观察时,应用阻光挡板阻挡激发光。

(7) 用油镜观察时,应用无荧光油。

(8) 荧光显微镜光源寿命有限,超过 90 min,超高压汞灯发光强度逐渐下降,荧光减弱,所以每次使用 1~2 h,最多不超过 3 h。

(9) 电源最好装稳压器,否则电压不稳不仅会降低汞灯寿命,也会影响镜检的效果。

四、实验讨论及作业

简述荧光显微镜的使用方法。

■ 高淑萍 ■

第三节 倒置相差显微镜的结构和使用

倒置相差显微镜和放大镜起着同样的作用,就是把近处的微小物体放大成虚像以供人眼观察,只是显微镜比放大镜具有更高的放大率,其具体原理与普通光学显微镜原理相同,只不过物镜的位置不同,前者物镜在载物台下方,后者物镜在载物台上方。倒置相差显微镜主要用于观察培养的活细胞的细微结构。

一、实验目的

熟悉倒置相差显微镜的结构和使用方法。

二、实验材料

倒置相差显微镜、体外培养细胞。

三、实验内容

(一) 倒置相差显微镜的原理与应用

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。光波通过物体时的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,光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,光波的相位发生变化(相应发生的差异),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。倒置相差显微镜就是将经过透明物体的直射光延迟或提前 $1/4$ 波长,并和绕射光产生干涉,使相位差变为振幅差。如果产生的干涉为相长干涉,则振幅的同相量相加而变大,我们便看到较亮的部分;如果所产生的干涉为相消干涉,则振幅的异向量相抵消而变小,这部分就变得较暗。变相位差为振幅差的结果,使原来透明的物体表现出明显的明暗差异,对比度增加,能更清晰地观察活细胞的微细结构。

(二) 倒置相差显微镜的结构

在普通光学显微镜上增加下列四种附件就成为倒置相差显微镜(图 1-3-1)。

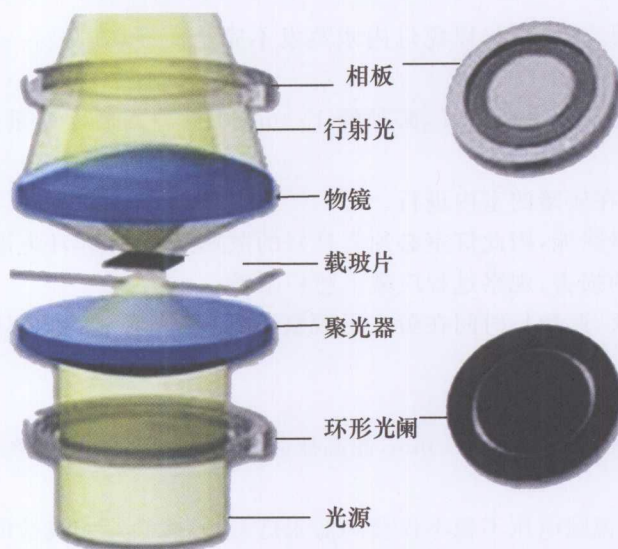


图 1-3-1 倒置相差显微镜光路示意图

1. 环形光阑 环形光阑位于光源与聚光器之间,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。大小不同的环形光阑成一转盘。更换放大率不同的物镜时,要同时更换与其相应的环形光阑。其作用是使照明光线从环状的透明区进入聚光镜,再斜射到标本上。

2. 相差物镜(镜头上有 PC 或 PH 字样) 物镜的后焦平面上装有相板,这是倒置相差显微镜的主要装置。相板上和环状光阑相对应的环状部分大多数是涂的吸收膜和推迟相位膜,其他部分完全透明。从标本上射过来的光线,绕射光部分穿过透明区;直射光则穿过相板的环状部分,一般所用的相板推迟相位 $1/4$ 波长,吸收 80% 的直射光,这样就使直射光和绕射光的强度接近,明暗反差增大。由于透明标本内部构造的折射率不同,产生绕射光的相位就会有不同程度的推迟,绕射光和直射光的干涉作用将相位差变成振幅差。

3. 绿色滤光片 在环状光阑下面置绿色滤光片于光路中,它可吸收红光和蓝光,使波长范围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。一般选用中心波长 546 nm 的绿色滤光镜,滤光镜插入后对比度就提高。

4. 合轴调整望远镜 为使环形光阑的中心与物镜的光轴完全在一直线上,必须拔出目镜,装上特别的低倍望远镜,使相板的暗环与环状光阑的明环重合对齐才能发挥相差显微镜的效能。

(三) 倒置相差显微镜的使用步骤

(1) 打开倒置相差显微镜的电源开关,将标本置于载物台上。

(2) 转动聚光器下面的环形光阑转盘,使普通光阑进入光路,并将光阑开到最大。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以看见标本。

(3) 转动转换器,使相差物镜($20\times$)对准标本,同时转动环形光阑转盘选用 $20\times$ 标示孔的光阑,以使环形光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应,用细调螺旋调节焦距,使物像清晰。

(4) 合轴调节:将合轴调整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,当对准焦点时就能看到环形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