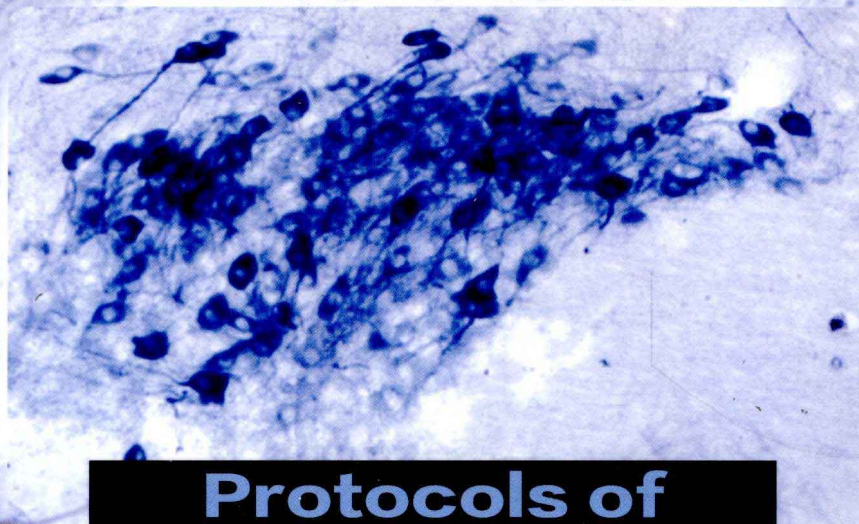




Protocols of
Cell Biology Techniques

细胞生物学 实验技术

章静波 黄东阳 方 瑾 主编



化学工业出版社

Protocols of

Cell Biology Techniques

细胞生物学 实验技术

第二版

章静波 黄东阳 方 瑾 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

编写人员名单

主 编 章静波 黄东阳 方 瑾

编写人员 (按姓名汉语拼音排序)

曹翠丽	河北医科大学
陈 峰	哈尔滨医科大学
董子明	郑州大学医学院
方 瑾	中国医科大学
顾 蓓	中国医学科学院基础医学研究所
韩 钦	中国医学科学院基础医学研究所
胡凤英	包头医学院
黄 辰	西安交通大学医学院
黄东阳	汕头大学医学院
连小华	第三军医大学
刘 雯	复旦大学上海医学院
刘晓颖	安徽医科大学
刘玉琴	中国医学科学院基础医学研究所
米立国	河北医科大学
欧咏虹	中山医科大学
邵红莲	山东大学生命科学院
石 嵘	南方医科大学基因工程研究所
谭玉珍	复旦大学上海医学院
王海杰	复旦大学上海医学院
王 惠	中国医学科学院基础医学研究所
王莎丽	中国医学科学院基础医学研究所
王越晖	吉林大学第二医院
杨 恬	第三军医大学
詹秀琴	南京中医药大学
张 宏	中国医学科学院基础医学研究所
章静波	中国医学科学院基础医学研究所
赵永娟	中国医学科学院基础医学研究所
朱利娜	南方医科大学

主 审 宋今丹
学术秘书 王 惠

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催化了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和促进了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同

时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前 言

自《细胞生物学实验技术》(第一版)问世以来,已5年过去了。我们见证了细胞生物学领域又有诸多的重要进展,譬如端粒与端粒酶的研究、诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)的研究、组学革命(omics revaluation)、细胞自噬的深入研究等。正如前一版前言中,我们强调指出学科的发展是与技术方法的创新与改良密不可分的,只有有了更精细的技术方法才能揭示出事物的本质变化的规律、事件之间的相互联系。因此技术方法与学科发展是一对孪生兄弟,是比翼双飞的鸟儿,缺一不可共存、缺一不可远翔。上述所列的一些新进展也是和新技术方法出现分不开的。

为了跟上学科的发展,适应发展的需要,我们也与时俱进地推出《细胞生物学实验技术》第二版,我们对该版的定位是:适合大多数院校(普通高等学校及医药院校)研究生与本科生学习细胞生物技术方法的需要。因此,该版的特点是:以基础训练为主,同时增加最新而又不难掌握与了解的技术,也就是说我们所遵循的仍是“三基”与“五性”的原则。为此,在本版中除了保留原有大部分内容之外,根据反馈意见增加了作为生物学与医学研究最基本手段的组织学切片及基本染色技术。此外,我们也适时地补充了多种干细胞培养的培养方法、鉴定及运用,其中包括诱导多潜能干细胞和肿瘤干细胞培养、细胞自噬、端粒与端粒酶显示技术、酵母双杂交技术、昆虫杆状病毒表达系统等,这不仅反映了技术方法的时代性,更让使用者能够熟悉这些新的技术方法,以便今后能进行更深入、更高层次的探索。

此外,由于有时为了证明某一现象可以有多种方法,其中有些是最常用的,或者是最可靠的,或是对于初学者必须掌握而且容易掌握的,有些则是“辅助性的”,或是“佐证性的”,为此本版也尝试采用如同《精编细胞生物学实验指南》(Short Protocols in Cell Biology, ed by J S Bonifacino, et al, by John Wiley & Sons. Inc.)那样将所介绍的方法分为基本方案、备择方案和支持方案3类。基本方案是指总体推荐或是最普遍应用的方法,也是使用者应力求掌握的方法。备择方案乃针对采用不同设备和试剂而达到相同结果时可选用者,或许可以认为它是基本方案的一种补充与佐证。支持方案所描述的是进行基本方案或备择方案所需要的那些附加步骤,这些步骤独立于核心方案,它们或许也可以在其他实验中用到。诚然,这样分类只是强调各种方案在证明一种现象中所起的作用分量有所不同,以及要求学习者必须掌握的程度不一,各个学校可根据具体情况、实验条件灵活选择运用。

最后,我们十分感谢参加编写的全体新老编委们,是他们的高度责任心与不厌其烦地不断修改才使得第二版以新的面貌问世。我同样感激化学工业出版社生物·医药出版分社的编辑们,是他们的耐心指导与建议,才让我们又一次燃起再版的热情与坚持到底的努力。我们诚望使用者从本书中获益以及对我们的不足与错误之处提出批评。

章静波

2011年夏于北京协和医学院

第一版前言

技术方法对于科学发展的重要性是不言而喻的。有人将技术方法比喻为机车的车轮，设计再好的机车，没有车轮是不可能行进的。较生动的比喻大概要算将技术方法比作“点石成金”的指头，金子再多也有用完的时候，而这“指头”的魔力则是无穷尽的。我更愿意将技术方法与科研思路比喻为鸟儿的双翼，两者缺一不可到达终极目标。

细胞生物学学科的发展，同样离不开新的技术方法的建立。只有应用显微镜观察到植物和动物的细胞结构，才有了细胞学说（恩格斯将其列为 19 世纪“三大发现”之一）的创立；只有有了 X 射线衍射技术方能揭示出 DNA 的双螺旋结构模式，并从此开辟了分子细胞生物学的新纪元；只有有了核移植技术，才有克隆动物（或许将来还有克隆人）的问世。由上我们可以得出这样的结论：没有精湛的技术方法，就不能（至少很难）登上科学的殿堂。或许正是认识到这一点，美国冷泉港实验室在取得众多科研成果、培养了大量科技人员之外，也没有忽视出版一批技术方法的书籍，诸如《分子克隆》（Molecular Cloning）、《细胞实验指南》（Cell: A Laboratory Manual）和《抗体》（Antibodies）等。有人评价这些书籍是生命科学研究的“圣经”。

细胞生物学及相关学科在我国的发展极为迅速。迄今我国有不少世界一流的实验室，也取得了一些世界一流的科研成果，但总体来说，我国细胞生物学的研究与世界最前列还有一定的差距。当然其因素是多种多样的，缘由是复杂的。我们相信，我国科研人员的头脑与国外的同行一样优秀，这些差距可能出于我们的技术设备要差一点，所掌握的技术方法尚不够精良与全面，因此做起科学研究来往往往要滞后一些。为了缩小这种与最先进实验室的差距，学习与掌握最基础与最先进的研究技术方法，不能不说是一条重要的途径。编写一部新颖、实用的技术方法指导，不失为适时的一种举措。

本书的大部分作者曾参与《医学细胞生物学实验指导》的编写，他们既有从事科研工作的经验，又有教学经历，他们在具有丰富的感性认识与理性认识的基础上，从众多的技术方法中精选出部分操作程序介绍给读者。相信这些程序均具有严密性、可重复性、可操作性以及一定的新颖性。因此书中介绍的实验技术无论对于一个初涉细胞生物学研究的新手，还是具有丰富实验室工作经验的科研工作者，都有一定的帮助。

诚然，细胞生物学作为 21 世纪最活跃的生物科学学科之一，新理论以及新技术方法不断涌现，本书不能穷尽所有方法，也不一定包含刚刚问世的最新技术，它只能引导读者进入细胞生物学的研究领域，今后更多的理论创建与技术方法的革新便有待于大家的努力了。另外，我们并不固执己见，并不认为我们所提供的操作程序是不可变更的，如果使用者在正确的理论指导下，对我们提供的技术方法做出某些修改，并且证明更行之有效，那么请不吝将您宝贵的意见反馈给我们，以便我们能以适当的方式采纳，使本书所提供的技术方法更加先进，更加完善。

最后，我们要感谢那些虽不是本书的作者，但提供某些有用信息、数据、图片的人们，他们的无私奉献为本书增色。我们更要感谢化学工业出版社现代生物技术与医药科技出版中心的编辑们，他们为出版《生物实验室系列》图书所表现出的敬业精神，是我们编写《细胞生物学实验技术》的动力之一，与他们的精诚合作是一件颇为愉快的事，是以不能不在此书真诚地写上一笔以记之。

章静波

2006 年 2 月 5 日

目

录

第一章 显微镜技术	1
基本方案 1 普通显微镜的构造及使用 方法	1
基本方案 2 相差显微镜的构造及使用 方法	6
基本方案 3 荧光显微镜的构造及使用 方法	8
基本方案 4 透射电子显微镜与超薄切片 技术	11
基本方案 5 扫描电子显微镜与样品制备	15
备择方案 1 激光扫描共聚焦显微镜的构造 及使用方法	18
备择方案 2 激光捕获显微切割技术	25
支持方案 显微摄影技术	27
第二章 组织学基本技术	30
基本方案 1 石蜡切片技术	30
基本方案 2 冰冻切片技术	32
基本方案 3 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin stain, HE) 染色技术	33
备择方案 1 吉姆萨 (Giemsa) 染色技术	35
备择方案 2 组织学切片的 Feulgen 染色 技术	35
备择方案 3 中性脂肪油红 O 显示 (Oil red O stain) 技术	37
备择方案 4 组织切片的碱性磷酸酶 染色技术 (ALP 钙-钴法)	38
备择方案 5 组织切片的琥珀酸脱 氢酶染色 (SDH stain) 技术	39
备择方案 6 组织切片的核酸甲苯胺蓝显示 技术	40
第三章 细胞结构与成分的显示技术	41
基本方案 1 细胞中 DNA 和 RNA 的显示	41
基本方案 2 细胞中过氧化物酶的显示	45
基本方案 3 细胞中碱性蛋白的显示	46
基本方案 4 一氧化氮合酶的显示	47
基本方案 5 细胞中线粒体的活体染色	51
基本方案 6 细胞中糖类和脂类的显示	52
基本方案 7 酸性磷酸酶的显示	54
备择方案 1 细胞中液泡系的活体染色	55

备择方案 2 培养细胞完整生物膜系统的 观察	56
备择方案 3 微丝的染色及形态观察	57
支持方案 间接免疫荧光技术显示胞质 微管	59
第四章 细胞生理实验	62
基本方案 1 细胞的运动	62
基本方案 2 细胞的吞噬活动	63
基本方案 3 细胞自噬检测方法	65
备择方案 细胞膜通透性的测定	69
第五章 细胞培养和分析	71
基本方案 1 细胞的原代培养	71
基本方案 2 培养细胞的形态观察和计数	74
基本方案 3 培养细胞生长曲线的绘制和 分裂指数的测定	77
基本方案 4 细胞集落形成实验	79
基本方案 5 器官培养方法	80
基本方案 6 鸡胚尿囊培养法	83
备择方案 1 细胞的传代培养	85
备择方案 2 MTT 对细胞生长状况的 检测	86
备择方案 3 表皮细胞的培养	87
备择方案 4 骨骼肌细胞的培养	89
备择方案 5 内皮细胞的培养	90
备择方案 6 神经胶质细胞的培养	91
备择方案 7 骨髓间充质干细胞的培养 及其体外诱导分化	92
支持方案 1 细胞的冻存与复苏	93
支持方案 2 细胞显微测量技术	95
支持方案 3 细胞培养中支原体污染的 检测	96
支持方案 4 放射自显影术及同位素液闪 测定	100
第六章 干细胞培养及诱导分化	106
基本方案 1 人胚胎干细胞传代培养	106
基本方案 2 人胚胎干细胞的诱导分化	108
基本方案 3 肿瘤干细胞的分离纯化	113
备择方案 诱导多潜能干细胞	118

支持方案	小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的分离及饲养层的制备	120	(DNA ladder)	166
第七章 细胞周期分析		124	备择方案 1	凋亡细胞的电镜观察
基本方案	流式细胞仪检测细胞周期	124	备择方案 2	凋亡细胞的原位末端标记法 检测
备择方案 1	细胞同步化实验	126	备择方案 3	凋亡细胞的单细胞电泳检测 ...
备择方案 2	通过分析 CDK 的活性检测 细胞周期	127	备择方案 4	凋亡细胞的流式细胞法检测 ...
第八章 细胞成分的分离与分析		130	支持方案	磷酸酰丝氨酸外化的流式 细胞术分析
基本方案 1	差速离心法分离细胞和细 胞器	130	第十一章 染色体技术	173
基本方案 2	密度梯度离心法分离细胞 组分	132	基本方案 1	染色体标本制备
基本方案 3	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 分离蛋白质	134	基本方案 2	端粒及端粒酶显示技术
基本方案 4	Western 印迹技术	135	备择方案 1	染色体显带技术
备择方案	免疫沉淀法	137	备择方案 2	性染色质的制备
支持方案	蛋白质的双向聚丙烯酰胺凝胶 电泳	138	备择方案 3	姐妹染色单体交换实验
第九章 细胞工程基础技术		143	备择方案 4	染色体原位杂交技术
基本方案 1	细胞融合实验	143	支持方案	染色体实验试剂配制
基本方案 2	单克隆抗体的制备	146	第十二章 分子细胞生物学技术	200
备择方案 1	染色体提前凝集标本的制备 ...	150	基本方案 1	DNA 提取及检测
备择方案 2	显微注射技术 (核移植)	152	基本方案 2	RNA 提取及检测
备择方案 3	DNA 转染实验 (绿色荧光 蛋白)	154	基本方案 3	Southern 印迹技术
支持方案	体外受精技术	158	基本方案 4	Northern 印迹技术
第十章 细胞凋亡的测定		162	基本方案 5	RNA 干扰技术
基本方案 1	凋亡细胞的普通光学镜观察	162	基本方案 6	酵母双杂交技术
基本方案 2	凋亡细胞的荧光显微镜观察 ...	164	备择方案 1	RT-PCR
基本方案 3	凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳 检测——DNA 梯状条带		备择方案 2	原位 PCR 技术
			备择方案 3	荧光定量 PCR 技术
			备择方案 4	基因芯片技术
			备择方案 5	原位缺口平移技术
			备择方案 6	染色质免疫沉淀法
			备择方案 7	昆虫杆状病毒表达系统
			备择方案 8	GST pull-down 分析
			参考文献	244

第一章 显微镜技术

显微镜发明于 16 世纪末, 17 世纪始应用于科学研究, 它大大扩充了人类的视野, 把人类的视觉从宏观引入到微观, 直接推动了 19 世纪细胞学、微生物学等学科的建立。

显微镜大致分为光学显微镜和电子显微镜两大类。光学显微镜是 1590 年由荷兰的 Jansen 父子发明。光学显微镜可把物体放大 1500 倍, 分辨的最小极限为 $0.2\mu\text{m}$, 其种类繁多, 本章中主要涉及的有以下几种。①普通光学显微镜, 其分辨率达微米级, 在细胞生物学领域, 它主要用于日常观察组织的显微结构以及细胞的形态、数量及生长状态等。②相差显微镜, 由 P. Zernike 于 1932 年发明。该显微镜通过将相位差变为振幅差, 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细微结构。用于观察未经染色的透明标本和活细胞。③荧光显微镜, 以紫外线为光源, 主要可以对一些自身可发射荧光或使用荧光染料或荧光抗体后能发射荧光的物质进行定性和定量研究。④激光扫描共聚焦显微镜, 是 20 世纪 80 年代发展起来的, 在荧光显微镜成像的基础上加装了激光扫描装置, 利用计算机进行图像处理, 可以对观察样品进行断层扫描和成像; 可以无损伤地观察和分析细胞的三维空间结构。同时, 激光扫描共聚焦显微镜也是活细胞的动态观察、多重免疫荧光标记和离子荧光标记观察的有力工具。值得一提的是, 美国加州大学伯克利分校的一组科学家在 2005 年发明了一种新型“超级”镜片, 这种镜片能够突破长期以来限制光学成像清晰度的物理上限。利用一层薄薄的银膜镜片和紫外线使分辨率达到 60nm 。

电子显微镜是 M. Knoll 和 E. Ruska 在 1931 年首先装配完成的。这种显微镜用高速电子束代替光束, 由于电子流的波长比光波短得多, 所以电子显微镜的放大倍数可达 80 万倍, 分辨的最小极限达 $0.1\sim 0.2\text{nm}$ 。本章中主要涉及以下两种。①透射电子显微镜, 它把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上, 电子与样品中的原子碰撞而改变方向, 形成明暗不同的影像。由于电子易散射或被物体吸收, 故穿透力低, 样品的密度、厚度等都会影响最后的成像质量, 因此必须制备更薄的超薄切片, 通常为 $50\sim 100\text{nm}$ 。②扫描电子显微镜技术, 用聚焦电子束在样品表面逐点扫描成像, 是一种研究物质微观结构 (纳米级) 的全新技术。其放大倍数可达 $10\sim 1000000$ 倍, 在生物科学研究中常被用于获取细胞或组织表面的立体成像。

另外, 本章内容中还包括了两种与显微镜密切相关的技术。①激光捕获显微切割技术, 它是在显微状态或显微镜直视下通过显微操作系统对欲选取的材料 (组织、细胞群、细胞、细胞内组分或染色体区带等) 进行切割分离, 并收集用于后续研究的技术。可以想见, 该技术的应用往往是许多深入研究工作的重要起始步骤。②显微摄影技术, 利用摄影装置来拍摄显微镜视野中所观察到的物像。在生物医学方面, 主要用于对正常细胞或病变细胞的显微形态学研究记录。

基本方案 1 普通显微镜的构造及使用方法

【原理与应用】

显微镜的主要部分是物镜和目镜, 为两组焦距较短的凸透镜, 其成像原理见图 1-1。图 1-1 中为方便起见, 物镜、目镜都以单块透镜表示。物镜的焦距 (F_1) 短, 目镜的焦距

(F_2) 略长。物体 AB 位于物镜的 2 倍焦距和 1 倍焦距之间, 所以在物镜的像方形成一个倒立的放大的实像 $A'B'$, 该像位于目镜的 1 倍焦距以内, 经目镜放大为虚像 $A''B''$, $A''B''$ 位于观察者眼睛的明视距离内。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, 所以我们用显微镜可以看清非常微小的物体, 只是眼睛通过目镜所看到的不是物体本身, 而是物体被物镜、目镜所成的已经放大了 2 次的倒立的像。

【仪器构造】

普通显微镜由三部分组成: 机械部分、照明部分和光学部分, 见图 1-2。

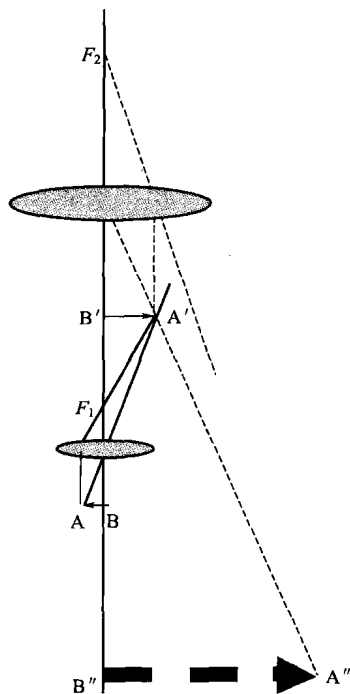


图 1-1 普通显微镜成像原理图

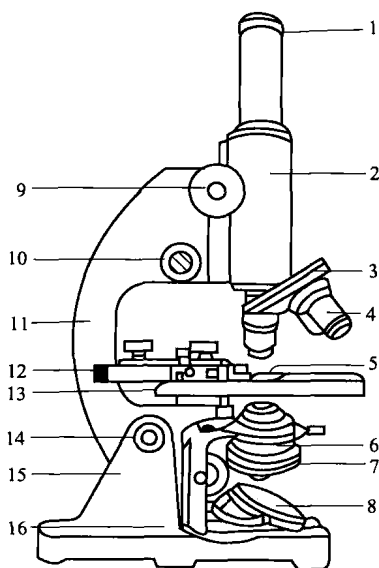


图 1-2 普通光学显微镜结构示意图

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

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,使用高倍镜、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——放大倍数和数值孔径(也叫镜口率),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,如 160(mm)/0.17(mm)。不同倍数物镜的技术参数见表 1-1。

表 1-1 不同倍数物镜的比较

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指标。其数值的大小反映该物镜分辨率的大小,数字越大,分辨率越高。

② 分辨率 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 0.1mm,显微镜的分辨率能达到 0.2μm。

分辨率与数值孔径的关系:

$$R=0.61\lambda/NA$$

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

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。

要提高分辨率,可采取使用短波长光源、采用介质折射率高的油浸系、增大孔径角以提高 NA 值等措施。

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物体之间的距离。镜检时,被检物体应处在物镜的 1 倍焦距至 2 倍焦距之间。因此,它与焦距是两个概念,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

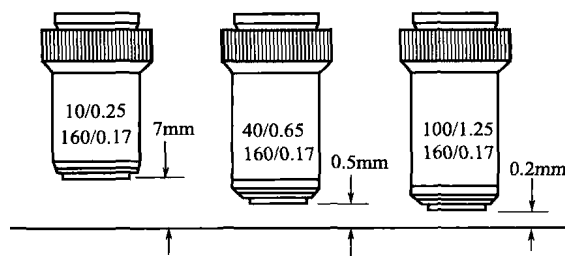


图 1-3 不同放大倍数的工作距离

距离越小。不同放大倍数物镜的工作距离见图 1-3。

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率不足，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。

【实验用品】

(1) 材料 “a” 字片、红绿羊毛交叉片、人血涂片、双层油镜瓶、擦镜纸。

(2) 设备 普通显微镜。

【实验方案】

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，显微镜应离实验台边缘至少一拳的距离。

(2) 对光 转动粗调节器，使镜台下降，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（转动时听到咔嚓声时，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，然后使低倍镜对准通光孔，开大光圈，上升聚光器并调节光线使视野明亮适中。

(3) 放置标本片 取标本片，盖玻片面朝上放在镜台上，用移片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，同时慢慢转动粗调节器，使镜台上升至物镜距标本片约 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,转动转换器使油镜镜头浸入油中。

(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,一边稍稍调节细调节器,使物像清晰。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,以免油玷污高倍镜头。

(5) 擦净油镜头和标本片 油镜使用完毕后上升镜头约 10mm,把镜头转到一边,取擦镜纸,滴少许二甲苯,将镜头上和标本上的香柏油轻轻擦去,再用干净擦镜纸擦干净,擦拭时要顺镜头的直径方向,不要沿镜头的圆周擦。

4. 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:你看到的物像是反还是正?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,在转换高倍物镜并且看清物像之后,可以根据需要调节孔径光阑的大小或聚光器的高低,使光线符合要求。注意分辨红绿羊毛的上下位置关系(利用细调节器升降镜台进行判断)。

(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率,并练习擦拭油镜头和标本片。

【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,切勿手持物镜移动。

(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,盖上绸布或外罩,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。

【实验结果及分析】

(1) 低倍镜观察“a”字片呈倒立的物像,且玻片的移动方向与视野内物像移动的方向相反。

(2) 高倍镜观察红绿羊毛交叉片,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。转动细调节器下降镜台时红色羊毛清晰,表明红色羊毛位于交叉点上方;上升镜台时,绿色羊毛清晰,表明绿色羊毛在交叉点的下方。

(3) 低倍镜、高倍镜、油镜观察人血细胞涂片时,观察范围依次变小,放大倍数、分辨率依次提高。血细胞包括红细胞、白细胞和血小板。其中白细胞主要包括淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。红细胞为双凹扁盘状,无细胞核,橘红色。白细胞形态不一,细胞核紫色;其

中淋巴细胞细胞核大而圆，周围边缘为浅蓝色细胞质；单核细胞，核为马蹄形或肾形，细胞质比例较大浅蓝色；粒细胞核成为叶状，细胞质中具有大小不等的颗粒。血小板为紫红色小片状，常多个聚在一起。

(邵红莲)

基本方案2 相差显微镜的构造及使用方法

【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。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(相应发生的差异即相差)，但是这种微小的变化，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时，则振幅异相量相消而变小，这部分就变得较暗。这样，变相位差为振幅差的结果，使原来透明的液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细微结构。

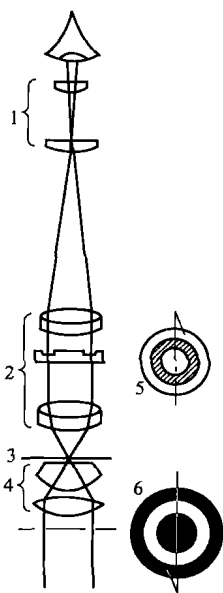


图 1-4 相差显微镜光路图示

1—目镜；2—物镜；3—标本片；4—聚光器；5—相板；6—环状光阑

【仪器构造】

在普通光学显微镜上增加下列四种附件就成为相差显微镜(图 1-4)。

1. 环状光阑

环状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。大小不同的环状光阑成一转盘。更换放大率不同的物镜时，要同时更换与其相应的环状光阑。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(镜头上标有 PC 或 PH 字样)

物镜的后焦平面上装有相板，这是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。一般选用中心波长 546nm 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

为使环状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。

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。倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope)用于观察培养瓶或培养板中的活细胞的细微结构;由于工作距离的限制,最大放大率为 $60\times$ 。一般研究用倒置相差显微镜配置有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 及 $40\times$ 相差物镜。

【实验用品】

- (1) 材料 体外培养细胞。
- (2) 设备 相差显微镜。

【实验方案】

1. 倒置相差显微镜的使用

- (1) 打开倒置相差显微镜电源开关,将标本置于载物台上。
- (2) 转动聚光器下面的环状光阑转盘,使普通光阑进入光路,并将光圈开到最大。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,看见标本。
- (3) 转动转换器,使相差物镜($20\times$)对准标本,同时转动环状光阑转盘选用 $20\times$ 标示孔的光阑,以使环状光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应,用细调节器调节焦距,使物像清楚。

(4) 合轴调节 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。如图 1-5 所示。如亮环比黑环小而位于内侧时,应降低聚光器使亮环放大;反之,则应升高聚光器,使亮环缩小。如若升到最高限度仍不能完全重合,则可能是载玻片过厚之故,应更换。

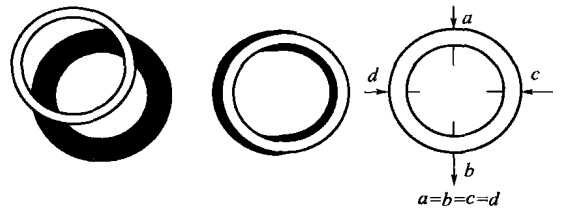


图 1-5 相差显微镜合轴调节

(5) 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。使用油镜时,聚光器上透镜表面与载玻片之间要同时加上香柏油。

2. 倒置相差显微镜使用练习

培养瓶或培养板中的培养细胞的观察。

【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 标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。

【实验结果及分析】

在倒置相差显微镜下观察活细胞,可清楚地分辨细胞的内部结构,细胞边界、细胞核、核仁以及胞质中存在的颗粒状结构清晰可见,分裂期细胞可见中期染色体。

(邵红莲)

基本方案3 荧光显微镜的构造及使用方法

【原理与应用】

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。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。

有些物质能够自发荧光，如维生素 A 的红色荧光、胶原纤维的蓝绿色荧光、绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的绿色荧光；有些物质不能够自发荧光，用荧光染料染色后，结合物可发出荧光。常用的荧光染料见表 1-2。

表 1-2 常用的荧光染料

荧光染料	激发光	荧光颜色	应用范围
溴化乙锭(ethidium)	蓝紫	红	DNA
HO33258(Hoechst33258)	紫外	蓝白	DNA
吖啶橙(acridine orange, AO)	蓝光	绿(DNA) 红(RNA)	DNA、RNA
派罗宁 Y(pyronin Y)	绿光	红	RNA
异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)	蓝光	黄绿	蛋白质及抗体标记
四乙基罗丹明(rhodamine, RIB200)	绿光	橘红	抗体标记
四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)	绿光	橘红	抗体标记
二醋酸酯荧光素(fluorescein diacetate, FDA)	蓝光	绿	细胞脂酶、细胞活力
芥子阿的平(quinacrine mustard, QM)	紫外	蓝白	染色体分带

2. 荧光显微镜原理

荧光显微镜采用高压汞灯作光源。汞灯是用石英玻璃制作，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 50~70 atm (5~7 MPa)，这一过程一般约需 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，它发射紫外到红色各色光，其中强紫外和蓝紫光等短波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激发光，同时阻挡对激发荧光没有用的光，短波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 1-6。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。

3. 荧光的猝灭

荧光分子的辐射能力在受到激发光较长时间的照射后会减弱甚至猝灭，这是由于激发态