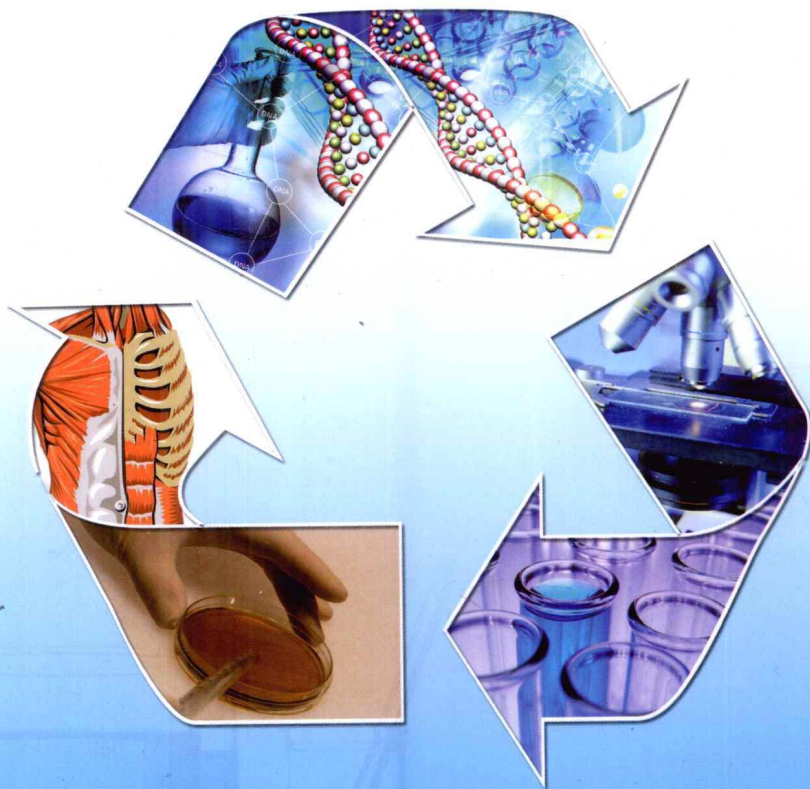


全国高等院校医学实验教学规划教材

医学微形态学实验

主编 刘 婷



科学出版社

全国高等医药院校医学微生物学规划教材

医学微生物学实验

主编 曹 彬



• • • • •

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学微形态学实验

主 编 刘 婷

副主编 廉 洁 张春庆

编 委 (按姓氏笔画排序)

王立平 刘 婷 刘楠楠

孙 贺 孙翠云 杨旭芳

张春庆 陈志伟 侯魁元

廉 洁

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书为医学微形态学实验教材,共分四篇:第一篇介绍了微形态学常用仪器——各种显微镜的使用以及基本实验方法;第二篇为经典验证性实验,包括组织学与胚胎学和病理学的经典实验;第三篇为综合性实验,融合了解剖学、组织学、病理学、内科学和诊断学等多个相关学科的理论 and 实验方法,改变了传统的演示验证式教学方式,有利于提高学生的综合思维能力和实践动手能力;第四篇是创新性实验,介绍了一些前沿的实验方法和研究思路,培养学生创新意识、创新能力和团结协作能力。

本书供医学各专业层次的组织学与胚胎学和病理学实验教学使用,也可作为医学研究生、青年医师的参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

医学微形态学实验 / 刘婷主编. —北京:科学出版社,2011

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-029349-7

I. 医… II. 刘… III. 人体形态学-实验-医学院校-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 208728 号

责任编辑:周万灏 许贵强 李国红 / 责任校对:朱光兰

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄华斌 黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏志印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年9月第二次印刷 印张:18 1/2 插页:24

印数:4 001—6 500 字数:436 000

定价:44.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

编委会

主 编 李 涛 张淑丽
副主编 刘伯阳 刘 婷 朱坤杰 郑立红 高 音 常东胜
潘洪明

编 者 (按姓氏笔画为序)

于英君	万永刚	马 勇	王 玉	王玉春	王玉阁
王立平	王贤雅	王晓东	王海君	王 斌	仇 惠
邓凤春	邓志会	卢长柱	田 华	冯 丽	吕丽艳
吕艳新	朱坤杰	朱金玲	刘 丹	刘文庆	刘伯阳
刘 富	刘 婷	刘楠楠	许 凤	纪 亮	孙石柱
孙东升	孙 革	孙 贺	孙翠云	杨旭芳	李公启
李志勇	李建蓉	李 涛	李鹏辉	肖 宇	吴艳敏
何 军	邹朝霞	沈 雷	宋 娟	张立平	张春庆
张 威	张淑丽	张淑玲	张 鹏	陈志伟	陈 萍
林 宇	林 岩	岳丽玲	金 莉	金海峰	周 波
郑立红	官 杰	赵丽晶	赵 堃	侯魁元	周逢丽
姚立杰	姚淑娟	柴 英	钱丽丽	徐 晋	高 音
高恒宇	高 涵	郭琳娜	梅庆步	常东胜	廉 洁
潘洪明	薛茂强	薛俭雷			

总 序

随着生命科学及其实验技术的飞速发展,我国高等医学教育对医学实验教学提出了更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,这对培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才具有重要意义。建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本系列教材的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学本质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两大特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,他们来自齐齐哈尔医学院、大连医科大学、天津医科大学、哈尔滨医科大学、牡丹江医学院、绍兴文理学院医学院、厦门大学医学院、陕西中医学院、中央民族大学、吉林医药学院、佳木斯大学、黑龙江中医药大学、华中科技大学同济医学院、北华大学等,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。

本系列实验教材将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共七本,包括《人体解剖学实验》、《医学微形态学实验》、《医学机能实验学》、《医学细胞生物学与遗传学实验》、《医学免疫学与病原生物学实验》、《医学物理学实验》和《医学化学实验》。

本系列教材读者对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、口腔、影像、检验、护理、药学、精神医学等专业需求,涵盖医学生基础医学全部的实验教学内容。

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

李 涛 张淑丽

2010年8月19日

前 言

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人才。在创新性医学人才的培养过程中,基础医学实验教学无疑是其中不可或缺的重要环节。它不仅培养学生的实验技能,而且培养学生的创新精神、科学态度和严谨作风,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地发展。

传统的实验教学基本上是以学科为中心的教学模式,依附于理论教学,多为重复性、验证性实验。同时,实验教学由于授课时间的先后不同,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,转变教学观念、改革教学方法、更新教学内容,密切基础教学与临床教学之间的相互联系,创建以学生为主的教学环境,围绕自主学习进行改革十分必要。

组织学与胚胎学和病理学同属于微形态学科,两者存在着重要而紧密的联系,但传统的实验教学不能体现这种关系。而且,这两门学科的实验课作为理论课教学的一种辅助手段,仅仅是为了让学生在实验中加深理论学习和一般形态的认识,通过实验验证理论,忽视了学生实验技能、实验操作以及观察过程的培养。

2002年,齐齐哈尔医学院将组织学与胚胎学和病理学实验室合并成微形态学实验室,微形态学实验突破了传统的学科界限,不是组织学与胚胎学和病理学实验的简单相加,而是通过有机的结合把这两个微形态学科紧密联系起来。运行8年收到了良好效果。我校教师联合其他三所院校开设此门课程的教师总结充实了微形态学实验的内容,编撰了本书。

《医学微形态学实验》吸收并反映本学科前沿的实验内容,体现微形态学各学科间的相互联系和相互交叉,系统地讲述科学实验的相关理论和医学实验的实用技术。全书共分四篇,包括医学微形态学实验方法和仪器、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验。其中综合性实验融合了解剖学、组织学、病理学、内科学和诊断学等多个相关学科的理论 and 实验方法,改变了传统的演示验证式教学方式,有利于提高学生的综合思维能力和实践动手能力;创新性实验是由教师引导学生自行完成查阅文献、设计方案、配制试剂、动物模型复制、实验操作、测量数据、结果分析、撰写论文等实验,实现从注重知识传授向更加重视能力和素质培养的转变,鼓励学生在课余时间进行设计性实验和科研实践活动,对于培养学生创新意识、创新能力、动手能力和团结协作能力的培养具有重要意义。

本书的筹划和编纂一直得到齐齐哈尔医学院各级领导的高度重视。在本书的编写过程中,编者始终严谨自律,本书编者均来自长期从事微形态学实验课程教学一线的老师,由于是初次编写,囿于水平有限,经验不足,书中难免存在疏漏和不当之处,衷心希望同行批评指正,以便再版时加以纠正。

刘 婷

2010年5月4日

目 录

绪论	(1)
----------	-----

第一篇 常用仪器及基本实验方法

第一章 常用实验工具——显微镜	(4)
第二章 医学形态学基本实验方法	(12)
实验一 大体标本的取材	(12)
实验二 组织切片制作	(13)
实验三 HE 染色	(17)
实验四 组织化学与细胞化学技术	(21)
实验五 免疫组织化学技术	(21)
实验六 原位杂交技术及其应用	(24)
实验七 组织细胞培养技术和组织工程	(27)
实验八 尸体解剖技术	(29)
实验九 显微切割技术	(35)

第二篇 经典验证性实验

第一章 组织学与胚胎学	(37)
实验一 上皮组织	(37)
实验二 固有结缔组织	(40)
实验三 软骨和骨	(43)
实验四 血液、淋巴与血细胞发生	(46)
实验五 肌组织	(49)
实验六 神经组织	(51)
实验七 神经系统	(55)
实验八 循环系统	(58)
实验九 免疫系统	(61)
实验十 皮肤	(64)
实验十一 消化管	(66)
实验十二 消化腺	(71)
实验十三 呼吸系统	(75)
实验十四 泌尿系统	(79)
实验十五 内分泌系统	(82)
实验十六 眼和耳	(85)
实验十七 男性生殖系统	(88)
实验十八 女性生殖系统	(91)
实验十九 胚胎学	(94)
组织学实验报告	(105)

第二章 病理学	(141)
实验一 细胞和组织的适应与损伤	(141)
实验二 损伤的修复	(144)
实验三 局部血液循环障碍	(145)
实验四 炎症	(149)
实验五 肿瘤	(151)
实验六 心血管系统疾病	(157)
实验七 呼吸系统疾病	(162)
实验八 消化系统疾病	(166)
实验九 淋巴造血系统疾病	(171)
实验十 泌尿系统疾病	(173)
实验十一 骨关节疾病	(178)
实验十二 生殖系统和乳腺疾病	(180)
实验十三 内分泌系统疾病	(185)
实验十四 神经系统疾病	(187)
实验十五 传染病	(189)
实验十六 寄生虫病	(193)
病理学实验报告	(195)

第三篇 综合性实验

第一章 形态学常用技术应用	(219)
实验一 组织切片的制作和 HE 染色	(219)
实验二 血涂片的制作与观察	(221)
实验三 用组织化学技术区别胶原纤维、网状纤维和弹性纤维	(222)
实验四 乳腺癌雌激素、孕激素受体检测	(223)
实验五 应用原位杂交技术检测宫颈癌 HPV 病毒	(224)
实验六 细胞凋亡的形态学观察与 TUNEL 法检测	(226)
实验七 正常组织细胞与肿瘤组织细胞的显微图像分析	(227)
实验八 造血祖细胞的培养	(228)
第二章 动物实验	(235)
实验一 鸡胚整封标本的制作	(235)
实验二 急性肺淤血、肺水肿动物模型建立及形态学观察	(238)
实验三 血液循环与脂肪栓塞	(239)
综合性实验报告	(233,241,243)
第三章 病例分析	(245)
实验一 非肿瘤性疾病	(245)
实验二 肿瘤性疾病	(252)
病例分析报告	(259)

第四篇 创新性实验

第一章 动物模型的建立与应用	(261)
实验一 胃溃疡的动物模型与影响因素实验设计	(261)
实验二 肝组织脂肪沉积的实验设计	(262)

实验三 急性血栓性肺栓塞动物模型的建立和实验设计	(263)
实验四 心肌梗死动物模型建立及实验设计	(264)
实验五 老年痴呆鼠模型建立及影响因素研究	(265)
第二章 肿瘤发生与生物学行为研究	(268)
实验一 癌与肉瘤的区别	(268)
实验二 微血管密度与癌转移关系的实验设计	(268)
实验三 抑制肿瘤细胞生长的实验设计	(269)
第三章 开放性创新实验	(271)
实验一 免疫相关性细胞形态的观察	(271)
实验二 小鼠活精子标本的制作与精子低渗肿胀实验	(273)
实验三 观察小鼠体外受精实验	(274)
实验四 橡皮泥制作颌面部及牙发育不同阶段模型	(275)
实验五 精子计数、涂片及畸形率的测定	(276)
实验六 蟾蜍口腔黏膜上皮细胞纤毛运动的观察	(278)
实验七 皮肤创伤愈合的形态学观察实验	(278)
创新性实验报告	(281)
参考文献	(285)

绪 论

一、微形态学实验的内容与意义

微形态学是重要的医学基础课之一。它由组织学与胚胎学和病理学组成,研究内容包括正常人体的细微结构及其功能关系;个体的发生发展及其变化的规律;疾病的病理、发病机制及发生发展的规律。微形态学实验不是组织学与胚胎学和病理学实验的简单相加,而是通过有机结合把这两个形态学科紧密联系起来。通过实验课对大体标本、组织学切片、模型、电镜照片、录像的观察和学习以及动物实验的操作对理论知识的理解和巩固起着重要的作用。

二、微形态学实验的学习目的

通过对微形态学实验课的学习,进一步理解和巩固相应科目的基本理论知识,掌握基本的实验技能,学会本课程常用仪器设备的正确使用和维护。加强科研能力的培养,学会选题、查阅文献、写综述、科研设计、实施实验撰写小论文,养成严谨的科研作风和严密的科研思维方法。养成良好的科学素养,重视实验,操作认真,观察仔细,记录精确、翔实,并能正确分析实验结果,写出规范的实验报告。培养综合素质,提高独立学习、独立工作、分析问题和解决问题的能力,为临床学习、工作打下基础。

三、微形态学实验的基本方法

微形态学实验的方法很多,下面介绍的是最基本的方法,大体标本观察和组织切片的显微镜观察。

(一) 大体标本的观察方法和步骤

病理实验和胚胎学实验要观察大体材料,这些材料主要来源于尸体解剖及临床手术切除标本。新鲜标本保持原来器官的大小、色泽和硬度,病变部分也保持原来的大小、硬度、质地、色泽等特点,这类标本是最理想的学习材料。但新鲜标本不易保存,所以在我们实验中所见的标本都是经过固定处理的。一般用10%福尔马林液固定。标本经固定后,即失去正常的色泽与弹性,同学在实验中应考虑这些因素。

在观察脏器病变时首先要有该脏器的正常解剖学知识,以下是观察大体标本的步骤。

(1) 先观察标本是哪一个脏器或属于脏器的哪一部分,如肺的上叶或下叶。若标本是从病人身体病变部分手术切除的(如切除的肿瘤标本),见不到完整的或部分的正常脏器,则要查明标本是取自哪一器官或哪一部分组织。

(2) 观察标本脏器的体积(大小)、重量;注意实质器官如肝、肾、脾是否肿大或缩小,有腔脏器如心、胃、肠的内腔是否扩大或缩小,腔壁是否变薄或增厚,腔中何有内容物等。

(3) 观察器官的形状,注意有无变形。

(4) 观察脏器的表面及切面(如为有腔脏器还应注意腔内表面有何改变),注意下列变化。颜色:暗红或苍白、淡黄或棕黄、灰色或黑色、绿色等。必须注意标本是天然颜色保存抑或福尔马林液固定。光滑度:平滑或粗糙。湿润度:湿润或干燥。透明度:正常脏器包膜(浆膜)非薄而半透明,病变时可变混浊。硬度:变硬或变软,韧实或松脆。

(5) 病灶(脏器中的病变部分或局限性病变)的观察及描述。分布及位置:在器官或肢体的哪一部分。数目:弥漫性或局限性,单个或多个。大小:体积以“长 cm×宽 cm×厚 cm”表示。形状:囊状或实性、乳头状、菜花状、息肉状、蕈状、结节状、溃疡等。颜色:红色表示病灶内含血液(若为福尔马林固定,则变为黑色);黄色表示含有脂肪或类脂;绿色或黄绿色表示含有胆汁;黑褐色表示含有黑色或褐色色素。与周围组织的关系:界限明显或模糊,是否压迫或破坏周围组织。

(6) 标本的诊断:通过病变的观察、分析、综合、鉴别之后做出诊断。诊断的写法一般是:器官名称+病理变化,如肝淤血、肾萎缩等。

(二) 组织切片的观察方法和步骤

切片标本最常采用苏木素-伊红(HE)染色。采用普通光学显微镜观察时,细胞核染成紫蓝色,细胞质和胶原纤维染成粉红色,红细胞呈橙红色。有的标本采用特殊染色。

(1) 观察切片时必须从肉眼→低倍→高倍,循序进行。先用肉眼观察,初步了解整个切片的情况,并发现病灶的所在部位(分布、形状等)。

(2) 然后将玻片放在载物台上(注意盖玻片要向上,不要放反,否则高倍镜不易准焦,并容易将玻片压坏),用低倍镜观察,观察时上下、左右移动切片,全面细致地观察,以确定切片是何种组织,病变发生在哪一部位,以及病变与正常组织的关系等。

(3) 高倍镜观察:高倍镜一般用来观察细胞的形态及其微细的结构。但必须注意,高倍镜是在低倍镜已经观察到病变全貌后再使用的。因此,一定要先用低倍镜找到要观察的组织结构后,固定于视野的中央,然后再转用高倍镜。切忌先用高倍寻找病变,易于遗漏。

(4) 镜检时应按组织学层次和结构进行观察,并注意病变位于何处,以何处为最突出。

(5) 最后把所见之主要病变用简单而整洁的图记录下来。

观察切片标本要注意切片一般仅是组织、器官的一部分,由于切片的部位和方向不同,可以观察到不同切面的形态结构,因此在观察标本时,应注意切面与立体的关系,以及局部与整体、异常形态与正常形态之间的关系,只有这样才不会在认识和理解病变时出现偏差,甚至错误。

在实习观察大体标本和切片标本时,必须将两者密切结合,两者并重,同时还应注意到标本的来源和病史,注意密切联系理论知识,这样才能对疾病有一个发展的和全面的认识。

四、作业要求

实习作业即是微形态学实验中的基本训练,又是培养学生严格的科学态度和认真准确记录科学结果的作风的手段。本实验教程增加了创新实验,要求学生自行设计实验,撰写小论文,有助于培养综合素质,提高独立学习、独立工作、分析问题和解决问题的能力。

绘图与填图作业的目的是将图像描述出来,易于加深理解,并可作课后回忆与参考,要求如下。

(1) 实习前必须先复习有关理论及相应科目知识。

(2) 绘图前应全面观察所画的组织结构,然后选择有代表性或典型结构进行描绘。绘图要真实,不能照图谱或凭想象绘图。

(3) 绘图方式基本是描绘镜下实物图,一般 HE 染色标本常用红蓝铅笔描绘,细胞核绘成蓝色,细胞质及胶原纤维等绘成红色。

(4) 绘图时要注意组织结构各部分之间的大小、比例及色调深浅,笔道均匀,从而正确反映镜下的结构特点。画好后,须用铅笔拉线,线要平行整齐,标明所画结构名称。

(5) 填图时要色彩清晰,层次清楚。

(6) 组织学特点的描述,要详细、准确。最后注明标本的名称,放大倍数,日期。

综合性实验和创新性实验实验报告书写要求如下。

- (1) 完整填写实验报告有关项目,字迹规整,文字精练。
- (2) 实验步骤:实验步骤每一项不必详述,如果所使用的仪器和方法与实验教材规定的有所不同时,可作简要说明。
- (3) 实验结果:应根据原始资料真实、准确记述所观察到的实验现象。实验中的每项观察都应有文字记录,实验结束后,再根据原始记录填写实验报告。填写实验报告时切不可弄虚作假。
- (4) 讨论:撰写实验讨论的过程是从感性认识到理性认识的升华过程。实验讨论又是以实验结果为依据的科学的推理分析过程,推理要符合逻辑,结果务必真实。在对结果进行分析的基础上推导出恰如其分的结论,而不是用现成的理论对实验结果作一般性解释。如果本实验未能揭示实验结果产生的原因或已知的理论知识难以解释出现的现象,应查阅有关文献资料寻找可能的解释,也可提出自己的见解,但必须提供解释依据,并注明文献出处。

五、微形态学实验注意事项

- (1) 实验前必须复习理论内容,并预习《医学微形态学实验》的相关部分,以便在实验时收到良好的效果。
- (2) 每次实验携带教科书、绘图铅笔等。
- (3) 实验室应保持安静,不得追逐、打闹、喧哗。
- (4) 实验室必须保持整洁,课后值日生认真打扫实验室。
- (5) 实习课一律穿白大衣,保持衣着整洁。
- (6) 爱护切片、标本、模型、显微镜等一切公物。如有损坏,登记赔偿。
- (7) 实验室仪器、设备、切片标本不得带出室外。
- (8) 珍惜动物,注意节约。

(刘 婷)

第一篇 常用仪器及基本实验方法

本篇主要介绍微形态学实验的常用仪器和基本实验方法,包括多种显微镜的结构和使用,光镜的常用方法,组织化学、免疫组织化学和原位杂交技术以及组织培养技术等,同时也介绍了微形态学实验常用的试剂。

第一章 常用实验工具——显微镜

显微镜是微形态学实验常用的仪器,包括各种光学显微镜和电子显微镜,本章主要介绍医学常用显微镜的原理、基本结构和使用方法。

第一节 普通光学显微镜

光学显微镜是贵重精密的光学仪器,是组织学实验的必备工具。在实验中,对同学们提出以下要求:①熟悉显微镜的各部分性能和用途,养成并坚持正确的使用方法;②掌握使用显微镜观察和分析组织标本的本领;③自觉遵守显微镜管理和使用制度。

一、显微镜的构造

显微镜可分为机械和光学两个部分。由于显微镜购置于不同厂家,因而结构上有所差异,希望同学们在实验过程中逐一了解。现以 LEICAXSP-EMED 生物显微镜为例,简单介绍其构造。

(一) 机械部分

1. **镜座** 呈方形,由底盖和基座两部分组成,基座内有变压器和照明用 6V/15W 溴钨灯。
2. **镜臂** 位于镜座上方,与镜座为一体结构。
3. **载物台** 为方形金属台。台上设有标本推进装置,可前后左右移动标本,其本身可以上下移动。
4. **镜筒** 双目镜筒,目镜具有视度调节圈。扳动镜筒,两镜筒的中心距可根据两瞳孔间距进行调节。
5. **物镜转换器** 位于镜筒下方,上接不同倍数的物镜,可根据需要进行选择。
6. **粗螺旋和细螺旋** 转一圈粗螺旋载物台可升降 15mm,转一圈细螺旋载物台可升降 0.002mm。

(二) 光学部分

1. **反光镜** 位于镜座中央,一面为平面镜,一面为凹面镜。
2. **集光器** 位于载物台下方,可上下升降来调节光度,上升光度增强,下降光度减弱。
3. **虹彩** 位于集光器下方,由许多重叠的小金属片组成,可开大或缩小虹彩的口径,调节光的强度。

4. **物镜** 有各种不同放大倍数的物镜。低倍镜为 $10\times$ ，高倍镜为 $40\times$ ，油浸镜为 $90\times$ 或 $100\times$ 。

5. **目镜** 每台显微镜上均配有多个放大倍数不同的目镜。目镜上刻有 $7\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$ 等符号。显微镜的放大倍数为目镜放大倍数和物镜放大倍数的乘积。

二、显微镜的使用方法

1. **显微镜拿法** 拿显微镜时必须一手握住镜臂，另一手托住镜座，以免目镜及反光镜失落损坏。

2. **显微镜放置** 显微镜放于桌面，距桌沿不得小于 10cm 。下课离开座位时，应将显微镜推向桌内，镜筒竖直，以免碰落造成损失。

3. **对光** 转动物镜转换器，对正低倍物镜，肉眼从镜侧注视，转动粗螺旋使物镜距载物台平面 5mm 左右。自目镜观察，打开虹彩光圈，一手扶着反光镜的边缘转动反光镜对向光源进行采光、调光，使整个视野得到均匀的亮光为准。如视野偏暗、明暗不均或模糊时，可从以下几个方面检查并做适当处理：①物镜是否对正；②反光镜的角度如何；③虹彩光圈开得大小如何；④集光镜的高低如何；⑤目镜、物镜、集光镜是否玷污。

4. **低倍镜观察** 对光完毕，取标本，使加有盖玻片的一面朝上，平放于载物台上，用标本推进器固定好，并将要观察的组织推移到载物台圆孔正中。然后，通过目镜观察，同时慢慢转动粗螺旋，使载物台下降，直至视野内物像清晰为止。

5. **高倍镜观察** 应先将需要高倍镜观察的组织结构移至低倍镜的视野正中，然后按顺时针的方向转动物镜转换器，对正高倍镜物镜，继之转动细螺旋即可得到清晰的物像。此时特别注意禁用粗螺旋，以免压碎标本，甚至损坏物镜。

6. **油浸镜观察** 在高倍镜观察的基础上，若要对某结构继续放大观察时，可使用 $90\times$ 或 $100\times$ 的油浸镜。使用前，现在标本视野中央滴 1 滴镜油，使油浸镜头与油面接触，调节细螺旋即可找到物像。使用后，用擦镜纸将镜头及盖玻片上镜油擦净，再用擦镜纸蘸少许乙醇及乙醚擦去物镜上的镜油。

7. **观察处理** 观察完毕后，取下标本放入标本盒内，整理显微镜，关闭电源，罩上镜罩。

三、显微镜使用注意事项

(1) 使用显微镜前，首先查看显微镜部件有无缺损、是否松动，并填写显微镜使用记录。

(2) 使用显微镜中，不得随意扳动、互换显微镜或互换镜头，不得擅自拆卸，如发现部件松动或损坏，应及时报告，进行维修。

(3) 维护显微镜清洁，发现不洁，及时擦净。各种镜头玷污，影响物像清晰程度，应取擦镜纸轻拭，切勿用手或手帕等擦拭，以防镜头被汗液或沙尘污损。

(4) 使用完显微镜，复正镜筒，物镜转离镜台中央圆孔并叉开，检查镜头、集光器、反光镜及标本推动器是否松动，确信无误后盖上镜罩，并填写使用记录。

第二节 倒置显微镜

倒置显微镜是把光源和聚光器安装在显微镜载物台的上方，物镜是放置在载物台的下方。由光源发出的光线经反光镜呈 90° 反射，垂直进入聚光器，再落射到标本的前后，被检物经载物台下方的物镜成像，再经棱镜组分光，一个像进入目镜的前焦平面上，另一个像进入镜座内的光路，在照相机的底片上感光，进行显微摄影。

倒置显微镜装配有各种附件,如相差长焦距聚光器和物镜、暗视野聚光器、荧光显微镜光源和滤片(激发滤片和阻断滤片)以及电影摄像机等,可进行多种实验观察。这种显微镜的特点是增大了载物台放置标本的高度,载物台上可以放置培养皿或培养瓶,还可以安装有机玻璃保温罩和自动恒温调节器,直接观察体外培养的细胞,及对活细胞进行各种实验的连续观察和拍摄电影。倒置显微镜还可装配显微操作器。显微操作器有各种类型,即手动操作式、油压驱动遥控式和微机控制式,附有细胞内注射和吸引体液等的微型泵、玻璃针、微型注射器、微型吸液管、电视装置和防振台等。防振台主要是一块铁板和若干橡皮球组成,放在显微镜镜座下面,使显微镜不受外部振动的影响。

防止振动是进行显微操作必不可少的条件。倒置显微镜与显微操作器组合应用,在从事细胞生理学、细胞药理学和胚胎学以及遗传工程学等研究中,可进行细胞内注射、吸引细胞内液、细胞切割及细胞核移植等操作。德国 Opton 公司以全新型万能倒置显微镜为基础,与自动显微注射系统和无限远色差校正的长工作距离光学系统相结合,能提供 70mm 的工作距离和足够的空间进行显微注射。其中自动显微操作器,可由杠杆控制进行 X、Y 两个方向的注射功能,更配有微机控制,使注射器的移动可微至 300nm 之精度,大大提高了注射的准确性。其最大优点是采用了电脑控制器,所需注射的细胞通过摄影机可显示于电视监视器上。配合简易操作的软件指令显微工作台及注射器定标,提高了工作的精度、速度和重复性。自动显微注射系统可同时记忆 100 个视场,每个视场内可定标 100 多个细胞,可作连续自动、快速和精确的注射,每小时最多可注射 2000 个细胞,同时可返回到每个细胞的位置进行观察。

第三节 荧光显微镜

一、实验原理

某些物质经一定波长的光(如紫外光)照射后,物质中的分子被激活,吸收能量后跃迁至激发态;当其从激发态返回到基态时,所吸收的能量除部分转化为热量或用于光化学反应外,其余较大部分则以光能形式辐射出来,由于能量没能全以光的形式辐射出来,故所辐射出的光的波长比激发光的要长,这种波长长的于激发光的可见光部就是荧光(fluorescence)。所谓荧光就是某些物质在一定波长光(如紫外光)的照射下、在极短时间内所发出的比照射光波长更长的可见光。由此可见,被照射物质产生荧光必须具备以下两个条件:①物质分子(或特异性结合的荧光染料)必须具有可吸收能量的生色团;②该物质还必须具有一定的量子产率和适宜的环境(如溶剂、pH、温度等)。荧光显微术是利用荧光显微镜结合可发荧光的物质进行观测的一种实验技术。某些物质在一定短波长的光(如紫外光)的照射下吸收光能进入激发态,从激发态回到基态时,就能在极短的时间内放射出比照射光波长更长的光(如可见光),这种光就称为荧光。有些生物体内的物质受激发光照射后可直接产生荧光,称为自发荧光(或直接荧光),如叶绿素的火红色荧光和木质素的黄色荧光等。有的生物材料本身不能产生荧光,但它吸收荧光染料后同样能发出荧光,这种荧光称为次生荧光(或间接荧光),如叶绿体吸附吖啶橙后便可发出橘红色荧光。荧光显微镜具特殊光源(多为紫外光光源),提供足够强度和波长的激发光,诱发荧光物质发出荧光。在视场中所观察到的图像,主要是样品的荧光映像。

二、使用方法

1. 荧光显微镜汞灯的点亮 ①打开启动器电源开关,按下启动钮不超过 5 秒,点亮汞灯,5min 后便进行观察。点亮后 15min 内,不可切断电源;此外,一旦汞灯熄灭后,在 20min 或稍长时间内,不许重新点亮,须待汞灯冷却后,方能再次点亮。②切片的放置:将所要观察的样本切

片置于荧光显微镜下观察。③样品聚焦:将切片放在载物台上,先用溴钨灯透射照明,用低倍镜聚焦,待找到最佳影像后,熄灭溴钨灯,改用高压汞灯。④调整荧光显微镜:在观察样品时,视场光阑(F)和孔径光阑(A)的开度适当缩小,同时选择滤镜系统和二向色镜,直至使样品的自发荧光达到最佳的观察效果。⑤荧光染色观察:向所制切片上滴加1~2滴0.01%吖啶橙染液,染色1min,洗去余液,加盖片后,在荧光显微镜下观察样本的间接荧光。

2. 荧光染料的使用 吖啶橙是最经典的灵敏的荧光染料,它可对细胞中的DNA和RNA同时染色而显示不同颜色的荧光,DNA呈绿色荧光,RNA呈橙红色荧光。EB:染色DNA和RNA。荧光素双乙酸酯(FDA):FDA本身无荧光,无极性,可透过完整的原生质膜。一旦进入原生质体后,由于受到酯酶分解而产生具有荧光的极性物质荧光素。它不能自由出入原生质膜,因此有活力的细胞能产生荧光,无活力的原生质体不能分解FDA无荧光产生。5mg FDA溶于1ml丙酮中,避光4℃下储存,使用时取0.22ml FDA储存液加入5ml 0.65mol/L甘露醇中。使用时,使最终浓度为0.01%。荧光染料Ho33342和罗丹明123:活细胞双荧光染色观察细胞核和线粒体。一般的生物染料不能穿透细胞膜,只有当细胞被固定后改变了细胞膜的通透性,染料才能进入细胞内。但有些活体染料能进入活细胞,并对细胞不产生毒性作用。荧光染料Ho33342和罗丹明123都是活体染料。Ho33342能与细胞中DNA进行特异的结合,罗丹明123能与线粒体进行特异的结合。采用两种荧光染料的混合染液可对一个活细胞的核和线粒体同时染色。

三、荧光组化实验中应注意的几个问题

(1) 每种荧光染料,均有自己的最适pH,此时荧光最强。当pH改变时,不仅荧光强度减弱,而且波长将有所改变,因此荧光检测时要在一定的pH的缓冲液中进行。

(2) 一般荧光染色在20℃以下时荧光比较稳定,温度升高常出现温度淬灭。

(3) 在荧光观察中,常因激发光的增强而使样品荧光很快衰竭,造成观察和照相困难。为此最好用能量小的长波长光进行观察,需照相时再适当增强激发光。

(4) 一般荧光染液的浓度在万分之一以下,甚至亿万分之一,也能使标本着色。在一定的限度内,荧光强度可随荧光素的浓度增加而增强,但超过限度,荧光强度反而下降,这是由于荧光分子间的缔合而使自身荧光淬灭所致。

第四节 相差显微镜

一、原理和结构特点

相差显微镜又称位相显微镜或相衬显微镜。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。当光通过物体时,如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,因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,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。相差显微镜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(通常标有PH的标记)代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑,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旁像中分出来。相板安装在物镜的后焦面处,相