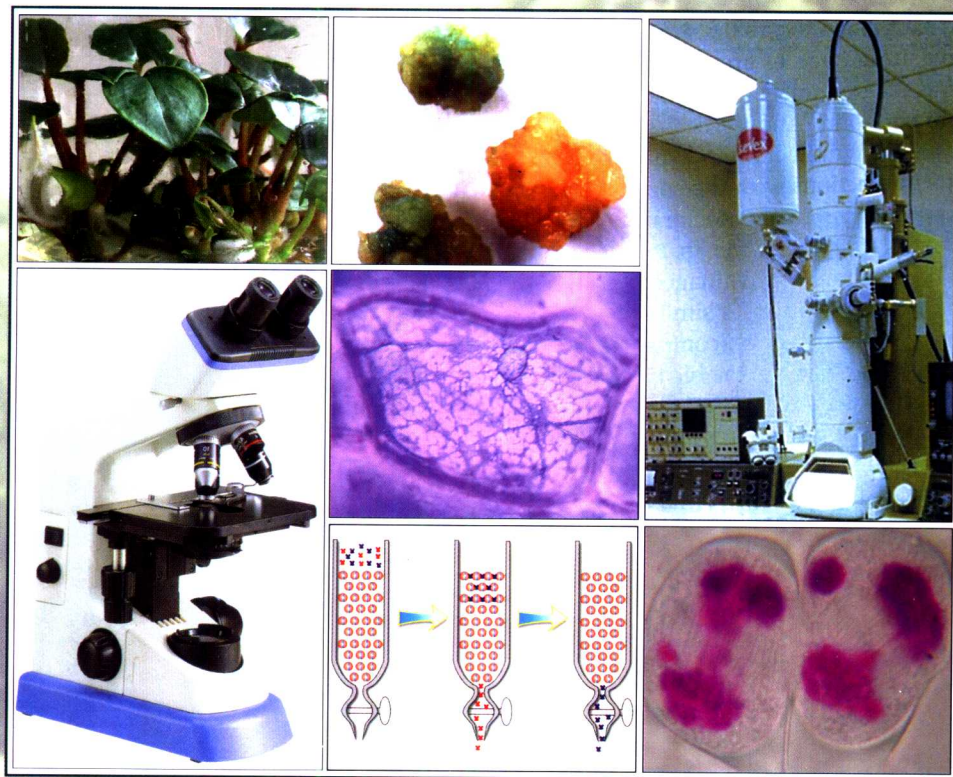


21世纪高等院校教材
国家理科基地教材

细胞生物学实验教程

王金发 何炎明 主编



 科学出版社
www.sciencep.com

21世纪高等院校教材
国家理科基地教材

细胞生物学实验教程

王金发 何炎明 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是王金发教授主持的《细胞生物学》立体化教材建设项目的实验教材。全书包括12章共64个实验,涵盖了部分经典的细胞生物学实验,又新增了一些与现代细胞生物学和分子生物学相关的新技术,内容包括光学显微镜技术、电子显微镜技术、细胞的形态结构、细胞化学、细胞生理、细胞分裂与染色体畸变、染色体技术与核型分析、细胞和组织培养技术、细胞化学成分的分离、蛋白质及核酸的定位与检测、细胞工程技术以及流式细胞技术、共聚焦显微技术、细胞凋亡检测技术等。

本书可供综合性大学、农林、医学、师范院校本科生和研究生的细胞生物学实验课教学使用,也可作为相关研究人员的参考用书,由于本书实验内容较多,在使用时可根据自身条件酌情选择。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程/王金发 何炎明主编. —北京:科学出版社, 2004.9

21世纪高等院校教材·国家理科基地教材
ISBN 7-03-013486-9

I. 细… II. 王… III. 细胞生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第050310号

责任编辑:谢灵玲 贾学文/责任校对:张 琪
责任印制:安春生/封面设计:陈 敬

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>

铁成印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年9月第一版 开本:850×1168 1/16

2004年9月第一次印刷 印张:13

印数:1—3 000 字数:293 000

定价:25.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

编者名单

王金发

何炎明

刘 兵

戚康标

冯冬茹

张利红

张为民

前 言

细胞生物学是高校生命科学的主干课程之一，是一门实验性很强的学科。生命科学的许多重大发现与细胞生物学实验技术的不断创新、发展是分不开的。因此，学习和掌握细胞生物学最基本的技术和最新的实验方法，对于从事生命科学研究的工作者来说是非常重要的和完全必要的。

由于细胞生物学已成为生物学重要的前沿学科，其发展速度之快可谓日新月异，各种研究的新方法、新技术如雨后春笋层出不穷。各学科之间的相互渗透、相互依存紧密相连，如细胞生物学与分子生物学、分子遗传学等实验技术之间就具有很强的依存性和相融性。细胞生物学实验技术的巨大变化，将推动细胞生物学向着更深的层次发展。我们为了紧跟学科发展的趋势，把握学科前进的方向，适应学科发展的需要，将多年来在教学和科研实践中积累及编写的细胞生物学技术编写成《细胞生物学实验教程》一书。旨在让学生能掌握细胞生物学研究的基本操作技能和新的实验技术，从细胞生物学的角度分析生物学中的问题，为独立进行研究打下基础。

本书是王金发教授主持的“细胞生物学立体化教材建设项目”的实验教材。全书共有 64 个实验，内容较丰富，知识面广，既包括经典的经典实验，又新增了不少与现代细胞生物学和分子生物学相关的新技术，如电穿孔和电融合技术、反转录病毒载体介导的基因转导技术、胚胎干细胞的培养和体外分化技术、流式细胞技术、细胞显微注射、共聚焦显微技术、细胞凋亡检测技术等。这些实验内容新颖、技术先进、可操作性强，对培养学生的动手能力、分析问题和解决问题的能力很有帮助。

本书由王金发教授统筹组织和审定，由编写组成员通力合作而成：第一至四章由戚康标编写；第五至七章由何炎明编写；第八章由何炎明、张利红编写；第九、十二章及附录由刘兵编写，并对全书进行文字编辑和校对；第十、十一章由张利红、张为民编写；冯冬茹参加了部分实验的初稿编写工作。

本书在编写过程中得到中山大学“国家理科基础科学研究与教学人才培养生物学基地”建设基金、中山大学博学工程项目资助，在此表示感谢。

由于编者的水平有限，书中难免有误，恳请广大读者给予批评指正。

编 者

2004年3月

目 录

第一章 光学显微镜技术	(1)
实验 1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法	(1)
实验 2 特殊显微镜的原理和使用	(7)
实验 3 显微摄影技术	(12)
实验 4 光学显微标本的制作技术	(22)
第二章 电子显微镜技术	(30)
实验 5 透射电子显微镜	(30)
实验 6 透射电子显微镜样品制备	(33)
实验 7 扫描电子显微镜	(37)
实验 8 扫描电子显微镜样品制备	(39)
第三章 细胞的形态结构	(41)
实验 9 细胞形态结构与几种细胞器的观察	(41)
实验 10 液泡系和线粒体的活体染色	(42)
实验 11 植物细胞骨架的光学显微镜观察	(45)
实验 12 细胞骨架的免疫荧光显示	(46)
实验 13 细胞的超微结构	(50)
实验 14 细胞的显微测量	(53)
第四章 细胞化学	(56)
实验 15 DNA 的细胞化学——Feulgen 反应	(56)
实验 16 RNA 的细胞化学——Brachet 反应	(58)
实验 17 细胞中多糖和过氧化物酶的定位	(59)
实验 18 细胞中酸性磷酸酶的定位	(61)
实验 19 细胞中碱性磷酸酶的定位	(63)
第五章 细胞生理	(65)
实验 20 小鼠巨噬细胞吞噬的观察	(65)
实验 21 胞饮作用	(66)
实验 22 细胞膜的通透性	(67)
实验 23 细胞电泳	(69)
第六章 细胞分裂与染色体畸变	(73)
实验 24 细胞的无丝分裂与有丝分裂	(73)
实验 25 细胞减数分裂	(75)
实验 26 环境因素及辐射诱变染色体改组的观察	(78)

第七章 染色体技术与核型分析	(81)
实验 27 植物染色体标本的制备和观察	(81)
实验 28 动物骨髓细胞染色体标本的制备	(83)
实验 29 人体外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备	(85)
实验 30 人类染色体 G 带技术	(88)
实验 31 植物染色体分带技术	(89)
实验 32 人类体细胞染色体组型分析	(91)
实验 33 染色体核仁组织区 (NOR) 的显示	(93)
实验 34 姊妹染色单体色差分析技术	(95)
第八章 细胞和组织培养技术	(98)
实验 35 植物组织培养技术	(98)
实验 36 原生质体的分离和培养	(101)
实验 37 植物体细胞杂交——原生质体的融合	(103)
实验 38 动物细胞原代培养	(105)
实验 39 传代细胞培养	(106)
实验 40 细胞的冻存与复苏	(108)
实验 41 哺乳动物胚胎干细胞的培养和体外分化	(110)
第九章 细胞化学成分的分离	(115)
实验 42 细胞核与线粒体的分级分离	(115)
实验 43 完整叶绿体的分离	(116)
实验 44 中期染色体的分离纯化	(119)
实验 45 动物细胞基因组 DNA 的提取	(121)
实验 46 植物基因组 DNA 的提取	(122)
实验 47 细胞和组织总 RNA 的提取	(124)
实验 48 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段	(125)
第十章 蛋白质、核酸的定位与检测	(128)
实验 49 地高辛标记探针的 Southern 杂交	(128)
实验 50 放射性标记探针的 Northern 杂交	(132)
实验 51 Western 印迹法 (蛋白质印迹法)	(136)
实验 52 蛋白质与蛋白质相互作用检测——酵母双杂交筛选	(140)
实验 53 原位 PCR	(143)
实验 54 用 ABC 法进行蛋白质的免疫定位	(147)
第十一章 细胞工程技术	(150)
实验 55 鸡血细胞的体外融合	(150)
实验 56 磷酸钙沉淀法将 DNA 导入细胞	(153)
实验 57 电穿孔和电融合技术	(154)
实验 58 反转录病毒载体介导的基因转导	(156)

实验 59 细胞显微注射技术	(158)
第十二章 其他技术	(163)
实验 60 细胞放射自显影	(163)
实验 61 流式细胞技术	(164)
实验 62 荧光标记技术	(170)
实验 63 细胞凋亡的检测	(172)
实验 64 共聚焦显微技术及去旋技术	(174)
主要参考文献	(187)
附录	(188)
附录 1 一些常用的换算	(188)
附录 2 常用试剂及溶液的配制和使用	(188)
附录 3 光学仪器保养与清洁的要点	(194)
附录 4 常用缩写汇编	(194)
附录 5 常用细菌培养基的配方	(197)

第一章 光学显微镜技术

显微镜是在人们认识到凸透镜放大作用的基础上发明的。据历史记载, 12 世纪阿拉伯人阿尔海琴已会磨制透镜。1604 年荷兰眼镜商詹森制造了第一台放大率不超过 10 倍的复式显微镜。半个多世纪后, 英国物理学家胡克创制了第一架具有科学研究价值的显微镜, 首次观察了木栓的显微图像, 并发现了细胞。真正观察到活细胞的是荷兰科学家列文虎克, 他用自制的显微镜观察到了池塘水中的原生动物, 还有人和哺乳类动物的精子、细菌等。可以说没有显微镜的发明就没有细胞的发现。

随着现代科学技术的发展, 显微镜的种类越来越多, 性能更加完善, 使用范围也越来越广泛, 不仅可以用来观察细胞形态和内部结构, 而且, 还可以通过与其他技术的结合, 进行细胞化学成分的定位、定性、定量以及物质代谢、细胞生理、免疫和遗传等功能方面的研究, 是细胞生物学研究中用途最广的仪器之一, 没有它也就无法打开生物界的微观大门。因此, 了解各种普通光学显微镜及其结构原理和操作方法具有重要的作用和意义。本章将介绍常用的普通光学显微镜和特殊显微镜的结构、原理、应用以及显微摄影技术。

实验 1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法

【实验目的】

- (1) 熟悉普通光学显微镜的主要结构和基本性能。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。
- (3) 初步了解光学显微镜的维护方法。

【实验原理】

普通光学显微镜 (microscope) 是最通用的一种光学显微镜。利用光线照明, 标本中各点依其光吸收 (即光的振幅发生变化) 的不同而在明亮的背景中成像。它由物镜、目镜、聚光镜、光源、载物台和支架等部件组成。其中聚光镜用于调节显微镜的照明, 物镜和目镜是放大微小物体成像的主要部件。其基本成像原理是: 目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜, 被检标本置于聚光器与物镜之间, 物镜可使标本在物镜的上方而形成倒立的放大实像 (倒像)。目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上, 形成一个直立的实像 (正像)。显微镜中放大的倒立的虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的, 该虚像看起来好像在离眼睛 250mm 处 (图 1-1)。

【实验仪器、材料和试剂】

普通光学显微镜、擦镜纸、动植物组织细胞装片、香柏油、二甲苯。

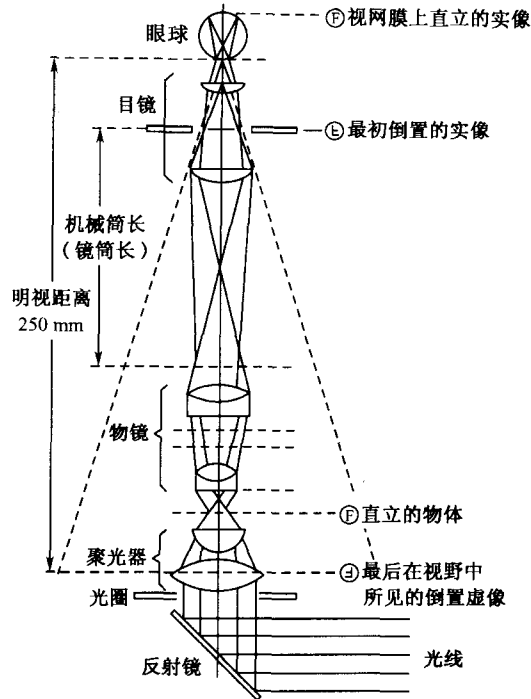


图 1-1 光学显微镜的放大原理及光路图

【实验内容与方法】

(一) 普通光学显微镜的基本构造

光学显微镜主要由三部分组成：机械部分、光学部分和照明部分（图 1-2）。

1. 机械部分

(1) 镜座 (base)：是显微镜的基座，起稳定和支持整个镜身的作用。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

(2) 镜柱 (pillar)：连接镜座和镜臂的短柱。

(3) 镜臂 (arm)：是支持镜筒和镜台的在镜柱上方弯曲的部分，拿镜时手握此臂，方便搬动。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有一可活动的关节叫倾斜关节，可使镜臂做适当倾斜，便于观察。使用时倾斜度一般不应超过 45° ，否则光镜重心偏移而容易翻倒。镜筒倾斜式显微镜由于镜臂和镜柱连为一体，故无此关节。

(4) 镜筒 (light tube)：位于镜臂前方的圆筒状结构，上端安装目镜，下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式两类（图 1-2），单筒式又分直立式和倾斜式两种，而双筒式的镜筒均为倾斜的。

(5) 转换器 (revolving nosepiece)：圆盘状，在镜筒下方，其上装有 3~4 个放大倍数不同的物镜，可以按顺时针或逆时针方向自由旋转。转换器的内缘有一“T”形卡，用于对准

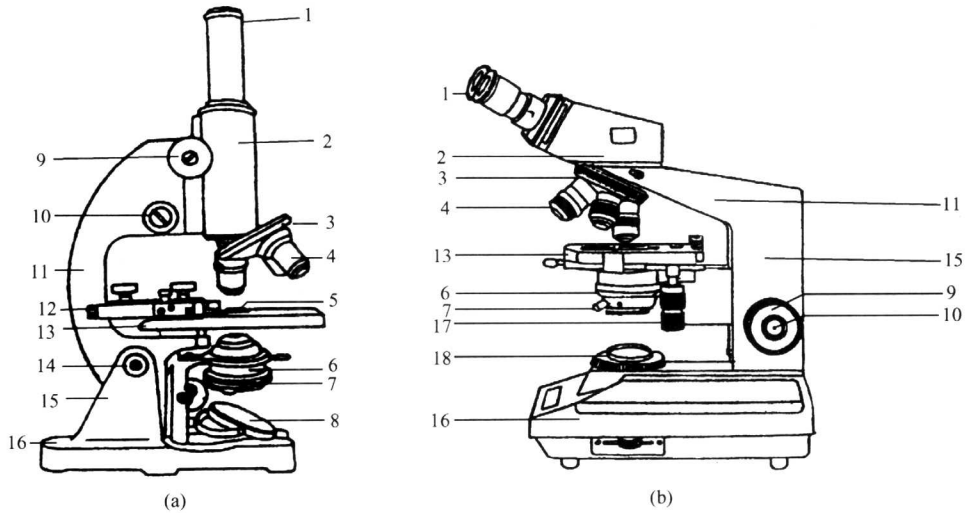


图 1-2 普通光学显微镜的结构示意图 (引自高文和等, 2001)

(a) 单目显微镜; (b) 双目显微镜

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; 17. 标本移动器螺旋; 18. 灯室

和固定物镜位置, 转动旋转盘可使不同的物镜到达工作位置, 使物镜和光轴同心 (合轴)。

(6) 载物台 (stage): 又称平台, 位于镜筒的下方, 方形或圆形, 放置玻片标本用。载物台的中央有一圆形通光孔, 两旁各有一压片夹。有的载物台上装有标本移动器, 移动器上装有弹簧夹, 用于固定标本片。移动器的一侧有两个旋钮, 转动旋钮可使玻片前后左右移动, 以方便寻找观察目标。在移动器上还附有一纵横游标尺, 用于计算标本移动的距离和确定标本的位置。

(7) 调节器 (regulator): 位于镜臂的上端或下端, 有一对大小旋钮, 为调节焦距之用。大旋钮为粗调节器, 转动粗调节钮可使镜筒 (或载物台) 升降, 调节焦距。旋转一周可使镜筒 (或载物台) 升降 10mm。一般用于低倍镜调焦。小旋钮为细调节器, 转动细调节钮可使镜筒 (或载物台) 缓慢升降, 每旋转一周约使镜筒 (或载物台) 升降 0.1mm。适用于高倍镜、油镜或分辨物像清晰度调焦。

2. 照明部分

(1) 反光镜 (reflecting mirror): 位于载物台下方, 镜柱前面的一个圆镜。镜的一面为平面, 另一面为凹面。平面镜聚光力弱, 适于强光源和平行光源。凹面镜聚光力强, 适用于弱光源或散射光源。反光镜的方位可以随意调节。较新的双筒光镜光源通常装在光镜的镜座内, 通过按钮控制开关, 镜座侧面有一滑动键或旋钮, 可调节光线强弱。

(2) 聚光器 (condensor): 在载物台下方, 由一组透镜组成, 可使反射光线聚集于标本上。一般在镜柱一侧有一旋钮, 可使聚光器升降, 与物镜配合使用。

(3) 光圈 (aperture): 在集光器下方, 由一组活动金属片组成, 构成一个可开可缩的孔。

在其外侧有一小柄，可以调节控制光线通过。在光圈的下方常装有滤光片架，可以放置不同颜色的滤光片。

3. 光学部分

(1) 目镜 (eyepiece): 又称接目镜，短圆筒状，装在镜筒上端，在目镜的侧面刻有放大倍数，每台显微镜常备有 3~4 只放大倍数不同的目镜，如 5×、10×、15× 等，在使用时，可根据不同的需要选择倍数的大小，最常用的是 10× 目镜。通过目镜就能观察到被放大的物像。

(2) 物镜 (objective): 装在物镜转换器上的一组镜头，一般有低倍镜、高倍镜、油镜三种。每个物镜上刻有相应的标记，低倍镜筒上刻有 10× 或 15× 等标志，高倍镜筒上刻有 40× 或 45× 标志，油镜上一般为 100×。NA 表示镜口率，镜口率反映镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨力越高。各种物镜的性质见表 1-1。

表 1-1 标准物镜的性质比较

放大倍数	镜口率 (NA)	分辨力/ μm	工作距离/mm
10	0.28	1.00	6.50
40	0.65	0.42	0.60
100	1.30	0.21	0.20

(二) 普通显微镜的性能和质量

光学显微镜的性能和质量的高低可受分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等的影响，这些指标都有一定限度，彼此间相互作用又相互制约，若改善或提高某方面的性能，都会使另一性能降低。

1. 分辨力

分辨力 (resolving power) 又称分辨率或分辨本领，指显微镜或人眼在 25cm 的明视距离处，能清楚地把两个被检细微物点分开的最小距离的能力。这两点之间的距离即为其分辨力，这个距离越近，其分辨力越高。据测定，人眼的分辨力约为 100 μm ，而光学显微镜的分辨力可达 0.2 μm 。显微镜的分辨力依下列公式来计算：

$$R = 0.61\lambda/\text{NA} \quad (\text{NA} = n \cdot \sin\theta)$$

式中， R 为分辨力； λ 为照明光源的波长，白光约为 0.5 μm ；NA 为镜口率； n 为介质的折射率， n 的最大值为 1.5； $\sin\theta$ 为透镜视锥半顶角的正弦。

2. 放大率

放大率是光学显微镜的另一个重要参数，光镜放大倍数的计算公式如下：

$$\text{实物放大倍数} = \text{物镜放大倍数} \times \text{目镜放大倍数}$$

光学显微镜常用的最大放大倍数一般为 1 600 倍。物镜放大率是对一定镜筒长度而言的，镜筒长度变化后，不仅放大率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此使用显微镜时，不能任意改变镜筒的长度。一般国际上将光学显微镜的标准镜筒长度定为 160mm，并标刻在物

镜的外壳上。

3. 焦点深度

当把焦点对准某一物点时，不仅位于该点平面上的各点都可看得清楚，而且在平面的上下一定厚度内也能看得清楚，这个清晰部分的厚度就是焦点深度。焦深与总放大率和镜口率成反比，因此高放大率和高镜口率显微镜的焦深就浅，不能看到标本的全厚度，必须调节螺旋改变焦距，并仔细地从上到下进行观察。

4. 视场亮度

视场亮度是指光学显微镜的整个视场的明暗程度。在使用光镜时，不更换物镜和目镜的情况下，视场亮度大，观察到的图像也就大。

(三) 显微镜的使用方法

1. 用前的准备工作

(1) 打开镜箱，右手握住镜臂，左手托住镜座，小心地把显微镜从镜箱内取出，轻轻地放在实验桌上。

(2) 检查显微镜的各部件是否完整和正常，如发现有部件损坏或出现故障，应立即停止使用，待排除故障或修复后，才能继续操作。

2. 低倍镜的使用

(1) 准备：将显微镜放于前方略偏左侧，必要时使镜筒倾斜（有的显微镜本身已经倾斜）以便观察。转动粗调节钮，将镜筒略升高（或将载物台下降）使物镜与载物台距离拉开，以免物镜与载物台相碰。然后旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔（可听到“咔哒”声）。

(2) 对光：打开光圈，上升聚光器，双眼同时睁开，以左眼向目镜内观察，双手并用，左手调焦，右手移片或绘图记录，同时调节反光镜的方向，使视野内的光线均匀，亮度适中。

(3) 放标本片：标本片的盖片朝上，将标本片放到载物台前方，然后推到物镜下面，用压片夹压住，如有标本移动器，可用上面的弹簧夹夹住标本片，然后把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(4) 调节焦距：从显微镜侧面注视物镜镜头，同时旋转粗调节钮，使镜筒缓慢下降（或镜台上升），低倍镜的镜头端与玻片间的距离约 5mm 时，再用左眼从目镜里观察视野，左手慢慢转动粗调节钮，使镜筒缓缓上升，直至视野中出现物像。如物像不太清晰，可转动细调节钮，使物像达到最清晰为止。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时，可能由以下原因造成：

(1) 转动调节钮太快，超过焦点，应按上述步骤重新调节焦距。

(2) 物镜没有对正，应对正后再观察。

(3) 标本没有放到视野内，应移动标本片寻找观察对象。

(4) 光线太强，尤其观察比较透明的标本或没有染色的标本时，易出现这种现象，应将光线调暗一些后再观察。

3. 高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野的中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜，用手移动转换器，换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微上下转动细调节钮，直至视野内看到清晰的物像为止。

如按上述操作仍看不到物像时，可能由下列原因造成：

(1) 观察的部分没在视野内，应在低倍镜下寻找到后，移到视野中央，再换高倍镜观察。

(2) 标本片放反了，应把标本片放正后，再按上述步骤操作。

(3) 焦距没调好，应仔细调节焦距。

有的显微镜高倍镜与低倍镜不配套，从低倍镜转换高倍镜时，往往转不过来或撞坏标本，如遇到这种情况，可把镜筒略升高（或载物台下降），直接用高倍镜调焦方法是：从侧面注视物镜，调节粗调节钮，使高倍镜头下降至与标本片最短距离，再观察目镜视野，慢慢调节细调节钮，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。如需要更换标本片时，应该先把镜筒升高（或载物台下降），然后把标本片移到载物台前方，再取下。

4. 油镜的使用方法

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像，把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开，在标本片上滴一滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，可来回调动细调节钮，即可看清物像。如仍看不清，应按上述步骤可重复。

(3) 找到物像后，再调节聚光器和光圈，选择最适光线。

(4) 油镜使用完毕后，把镜头上升约 10mm，并转到一边，用擦镜纸把镜头擦净。如仍擦不干净，可用擦镜纸蘸少许擦镜水或二甲苯轻擦，然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖片的标本片，可用擦镜纸蘸少许擦镜水或二甲苯，把油擦净。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油。方法是：先把一小张擦镜纸盖在油滴上，再滴上二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净。也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

5. 使用练习

(1) 低倍镜使用练习：取一张 A 字片，用低倍镜观察。练习对光、调焦，并注意观察物像与玻片移动方向是否一致，镜下观察的字母是正像还是反像？

(2) 高倍镜使用练习：取一张羊毛交叉片（染成红色），先用低倍镜观察，找到羊毛交叉点，移到视野中央，换高倍镜观察。调节焦距，注意观察上下羊毛的清晰度。

(3) 油镜使用练习：取一张人血涂片，先用低倍镜、高倍镜观察，再练习用油镜观察。注意比较三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同。练习分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和标本片。

(四) 使用显微镜的注意事项

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂，左手托镜座，切勿一手斜提，前后摆动，以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时，显微镜离实验台边缘应保持一定距离（5cm），以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过 45°，用完立即还原。

(3) 使用时要严格按步骤操作, 熟悉显微镜各部件性能, 掌握粗、细调节钮的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节钮向下时, 眼睛必须注视物镜头。

(4) 观察带有液体的临时标本时要加盖片, 不能使用倾斜关节, 以免液体污染镜头和显微镜。

(5) 粗、细调节钮要配合使用, 细调节钮不能单方向过度旋转, 调节焦距时, 要从侧面注视镜筒下降, 以免压坏标本和镜头。

(6) 用单筒显微镜观察标本, 应双眼同时睁开, 左眼观察物像, 右眼用以绘图, 左手调节焦距, 右手移动标本或绘图。

(7) 禁止随意拧开或调换目镜、物镜和聚光器等零件。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙东西擦拭, 以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂和药品, 如碘、乙醇溶液、酸类、碱类等都不可与显微镜接触, 如不慎污染时, 应立即擦干净。

(10) 实验完毕, 要将玻片取出, 用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开, 不能与通光孔相对。用绸布包好, 放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下曝晒。

【作业】

- (1) 填图注明光学显微镜各部件的结构名称。
- (2) 怎样区分低倍镜、高倍镜和油镜?
- (3) 简述使用低倍镜、高倍镜和油镜的主要步骤。

【思考题】

- (1) 为什么使用高倍镜和油镜时, 必须从低倍镜开始?
- (2) 显微镜下看到的物像是正像还是反像? 物像与玻片的移动方向是否一致? 为什么?
- (3) 简述使用显微镜的注意事项。

实验 2 特殊显微镜的原理和使用

光学显微镜在细胞生物学研究领域发挥着越来越重要的作用, 随着现代生物学技术与光学显微镜技术的发展, 光学显微镜的种类也越来越多, 现在除了普通光学显微镜以外, 已经研究出多种有特殊功能的光学显微镜, 如相差、暗视野、荧光、干涉、微分干涉反差等显微镜。由于它们都是在显微镜基本设计上发展出来的衍生装置, 所以有不少设计是在基本设备上换用附设的专用组件或添加特殊专用装置, 就成为能进行各种用途的一机多用镜, 使光学显微镜的应用技术从单纯形态学研究扩展到动态研究细胞结构与功能的关系领域。因此, 简单了解这些特殊显微镜的原理、特点与使用方法, 了解它们之间的差别和联系, 对细胞生物学的研究将会带来许多方便和帮助。

【实验目的】

通过演示和参观等形式掌握各种特殊显微镜的原理、构造及其使用方法。

【实验原理】

(一) 暗视野显微镜

暗视野显微镜 (dark ground microscope) 和普通显微镜相似, 只不过是利用暗视野照明法进行镜检, 它不能直接观察到照明光线, 只能观察到被检物体所反射或衍射的光线。因此, 视野呈黑暗的背景, 而被检物体则呈现明亮的像。

根据光学上丁达尔 (Tyndall) 现象, 微尘颗粒在强光穿过的情况下, 不能为肉眼所见。若使光线斜射它们, 则因光的反射或衍射, 尘粒似乎增大了体积, 便成为可见。例如, 一束强光射进昏暗的房间时, 我们可以在光束中见到超出人眼分辨的灰尘颗粒。暗视野显微镜就是依据此原理设计的。

暗视野照明法通用的有两种方式。

1. 中心遮光法

用中央纸板遮去中央光束, 然后将这样的纸板放在聚光器下面的滤光片支架上, 修整遮光面积和纸板大小, 使聚集在聚光器焦点的直接照明光线的中央光束遮掉, 视野基本黑暗, 而保证侧面斜射过来的光照亮被检物。

2. 暗视野聚光器法

常用抛物面聚光器, 中央有黑挡板以遮光, 并使落在抛物面上的光线无法反射出来, 当暗视野聚光器的数值孔径大于物镜的数值孔径时, 照明光线不能进入物镜, 只有标本的散射光线进入物镜。使用时将一般显微镜的聚光器换成暗视野聚光器, 做合轴调节, 在聚光器与载玻片之间加一滴香柏油, 即可进行调焦观察, 用毕后及时擦净油。使用时应注意: 载玻片、盖玻片都应洁净无痕, 否则散射光增多而使背景发亮; 载玻片厚度应在 1.1mm 以内, 否则光线将在载玻片内会聚而达不到标本。

暗视野显微镜能观察到 $0.2 \sim 0.004 \mu\text{m}$ 的亚微颗粒, 看到细胞在明视野照明下无法分辨的结构, 但无法分辨物体的内部结构, 因而它主要用来观察活细胞中微粒的运动, 观察单细胞、硅藻、放线菌、细菌的线状结构如纤维和鞭毛等。

(二) 相差显微镜

相差显微镜 (phase contrast microscope) 是能将物体本身的相位差 (或光程差) 转换为振幅 (光强度) 变化的显微镜。人的眼睛只能鉴别可见光的波长和振幅的变化, 但活的生物多为无色透明, 当光线通过时, 波长和振幅很少发生变化, 而生物材料各部分之间以及与环境之间往往有折射率的差别, 光线透过后可产生相位的改变。20 世纪 30 年代初期, 德国物理学家泽尼克根据“相衬法”原理, 首先设计并于 1932 年制造了第一台相差显微镜, 能将看不见的相位变化转变为看得见的振幅变化。

当光波通过活细胞的折射率不同的部位时, 一部分仍为相位和振幅相同的直射光, 另一部分由于光的衍射现象而向周围侧方发散出成为衍射光。当直射光和衍射光同时到达一点时, 两者互相干涉, 形成合成波, 合成波的强度取决于两光波的振幅和相差。为了利用两种光波

的干涉，在相差显微镜中设有 2 个特殊的装置：环状光阑与相板。直射光一般比衍射光要强很多，为了让衍射光对直射光有影响，要使直射光强度减弱。环状光阑和相板中环状金属涂层在光路中重叠（即同轴、同轴环）后，直射光经金属吸收、强度减至和衍射光差不多。相板的其余部分为比较厚的透明材料，使衍射光产生光程差的作用。一般设计为光程差 $1/4$ 周期（即 $\pi/4$ ）的厚度。假定其生物样品能使经过它们的光产生 $\pi/4$ 的光程差，这样的 2 个 $\pi/4$ 相加使衍射光产生 $\pi/2$ 的光程差。这时经过样品的衍射光和不经样品的直射光正好为波峰和波谷相遇，振幅为零，则样品呈黑暗。而某些生物样品若使衍射光推迟光程为 $3\pi/4$ 的，再加上相板推迟的 $\pi/4$ ，和直射光的光程相差正好为 π ，即正好为波峰与波峰相遇，合成波有 2 倍的振幅，样品区为最明亮。一般生物样品中各种结构推迟光程的能力不同，但都在上述 2 个极端之间，这样就会出现明暗程度不同的差别。

所以，相差显微镜的原理是将两种光程差（相位之差）转变为明暗之差，使不经染色的生物活样品由于对光程推迟的数值的不同而显示出明暗的差异。

在一台明视野显微镜上，装入具有环状光阑的聚光器和具有相板的相差物镜（常标有 ph 记号），就成为一台相差显微镜。环状光阑是一个不透明的玻璃圆盘有一个透明的圆环，使光线只能从这圆环中通过，具有环状光阑的聚光器称为相差聚光器，相差聚光器设有几个直径不同的环状光阑，分别对应于不同放大倍数的相差物镜。相板位于物镜后焦平面上，在一个透明圆盘中有一暗色圆环，整个相板涂有相位推迟物质，使通过环状光阑经标本后产生的衍射光、散射光的相位推迟 $1/4$ 波长，这样若物体使直射光比衍射光超前 $1/4$ 波长，合起来有 $1/2$ 波长的正相差，干涉结果使物体像暗而背景亮，暗相差结果则相反。暗色圆环部分还涂有光吸收物质，吸收部分直射光。每一相差物镜都有相应的环状光阑，即聚光器的各个环状光阑的直径、宽度是和相应的相板是一样的，因此，每调换一次不同倍数的相差物镜时，都须要转换一个相应的环状光阑，并将两者互校对齐，具体调节时应使在物镜后焦面上环状光阑中透明圆环的像与相板中的暗色圆环互相吻合，这样可以达到使直射光和衍射光分离的目的。

相差显微镜的调试方法为：首先将 10 倍相差物镜旋入光路，同时将相差聚光器的环板转盘转到字母“O”处，将样品置于载物台上，聚焦样品，再用柯勒照明法调节聚光器；然后将相应于 10 倍相差物镜的聚光器环状光阑移入光路中，完全打开聚光器的孔径光阑；取下一个目镜，插入聚焦望远镜，旋松其上的固紧螺丝，前后抽动望远镜的目镜，使物镜相板与聚光器环板成像清晰，再旋紧望远镜的固紧螺丝；把调节扳手插入相差聚光器转盘两后侧的孔内，调节使环板的亮环与相板的暗环重合；取出望远镜，换入目镜即可进行相差观察。

相差显微镜主要用于观察活体细胞、不染色的组织切片或减少反差的染色标本，但切片都不宜过厚，一般以不超过 $20\mu\text{m}$ 为宜，载玻片须均匀一致，厚度在 1mm 左右，盖玻片也以 $0.17\sim 0.18\text{mm}$ 的厚度为宜。

（三）荧光显微镜

荧光显微镜（fluorescence microscope）是利用较短波长的紫外光照射标本，使样品受到激发，产生较长波长的荧光，可用来观察和分析样品中产生荧光的成分和结构、位置，观察的