

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材
卫生部“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学 实验指导与习题集

第3版

主 审 宋今丹

主 编 章静波

副主编 黄东阳 方 瑾



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

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

卫生部“十二五”规划教材配套教材

全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学

实验指导与习题集

第3版



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与习题集/章静波主编.

—3版. —北京: 人民卫生出版社, 2014

ISBN 978-7-117-19886-8

I. ①医… II. ①章… 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 247476 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与习题集

第 3 版

主 编: 章静波

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: 北京市艺辉印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 23

字 数: 618 千字

版 次: 2004 年 12 月第 1 版 2015 年 1 月第 3 版

2015 年 1 月第 3 版第 1 次印刷 (总第 7 次印刷)

标准书号: ISBN 978-7-117-19886-8/R · 19887

定 价: 38.00 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)

► 第3版前言

经过前版的应用,事实证明,医学细胞生物学配套教材是很有用的。本教材包括两大部分,第一部分为细胞生物学实验指导,第二部分为习题集,这两部分与医学细胞生物学的教学密切相连。

通常,无论哪一门基础医学学科,均以理论讲授为主,极少或是不多有实验,历来细胞生物学均是如此。这样,一门课程下来,不少学生还是很难搞清那些包含有时空、动态因素在内的概念或是理论,或是假说,此时只能通过观察、实验方能加深对课堂理论的理解,甚至感悟到理论的真正内涵以及可能蕴藏着的、有待探索的奥秘。因此,实验起着佐证、补充、完善与丰富理论的作用。

习题集的作用向来遭到有些学者的反对,理由是不能全面反映教学内容。另外,习题集往往误导学生为考试而学习,会引导学生“投机取巧”,甚至让他们变得懒惰起来。诚然这种指责有一定道理,但更为关键的是教师们应当认识到习题集只是一种复习资料,它不可替代系统的理论课程,但它可以起到化繁为简、便于理解及提纲挈领的作用。在美国有一种速成课程(crash course),基本上也是用于应付考试的。他们还特别指出,出于细胞生物学和遗传学中有许多抽象的概念与理论尤其“难学”,因此出版这种考试大纲式的速成课程用书是十分必要的。要想起到这种积极作用,消除其缺点,编者要紧紧围绕课程的基本教学宗旨,出题有理,出题有据,更希望出题中体现已故医学教育家裘法祖院士提出的“三基”和“五性”的原则。

陈誉华教授主编的《医学细胞生物学》第5版已问世,希望本教材的出版不但只是“跟进”,更能够促进我国医学细胞生物学教育的发展。

章静波

于北京协和医学院

2014年10月

► 第2版前言

《医学细胞生物学实验指导与习题集》是医学细胞生物学的配套教材。该教材的出版有诸多的好处。首先，它表明细胞生物学不只是一门纯理论课，而且有很强的实践性。细胞生物学实验不仅可以佐证理论的科学性、严密性，而且丰富了或补充了理论知识，使医学细胞生物学成为一门立体性的学科。其次，通过细胞生物学实验，学生们不仅可以巩固课堂学到的理论知识，还具备一定的实际动手操作能力，可成为较全面的人才。第三，该教材所选择的实验内容都是细胞生物学中最基本、最重要的技术或方法，一旦使用者掌握了这些技术方法，他们便获得了从事科学研究的基本能力，为今后更深层次的科学探索奠定了基础。

诚然，随着细胞生物学的发展，尤其是随着细胞生物学与其他学科的融合，新理论、新技术层出不穷。因此，近年来有关细胞生物学技术的专著不断涌现，如J. E. Selis 主编的4卷本的 *Cell Biology, A Laboratory Handbook* (3th ed., 2008) (国内有导读本)，J. S. Bonifacino 所著的 *Short Protocols in Cell Biology* (有中文译本，2007) 等。老师或同学们如果了解与掌握更多的，可以从中选择操练。使用本配套教材的院校和师生可以根据自己的“校情”，有目的、有针对性地选择实验内容，或许这可称为“以校为本”、“学以致用”吧。

鉴于第1版的反馈意见，第2版在前版的基础上有不少的改动，主要是增加了部分实验内容，如细胞培养的某些基本操作训练、细胞膜片钳技术、基因芯片技术等，目的在于使本套教材具有更多的选择性。此外，特别指出，参加本版编写的院校也有扩大，除了原有的院校之外，还有幸邀请到北京大学医学部、浙江大学医学院、温州医科大学的老师们参与。因此，本版有更广泛的代表性与普遍适用性。希望本配套教材的出版能对振兴医学院校的医学细胞生物学教学起到一定的推动与相辅作用。

除了实验指导之外，一如前版，本书还包括习题集，主要依据陈誉华教授主编的《医学细胞生物学》最新版，即第4版为蓝本。从数年来的实践看，配套的习题练习对于巩固课堂的理论是大有裨益的，因为习题中所提出的问题类似于模拟考试的试题，一般来说都是所学内容的要点或精华所在。作为一个学生岂可不掌握书本的要点与精华呢？然而，也必须指出，习题集毕竟不可以替代理论课本，因为通常它缺乏如课本那样的完整性和连贯性。因此学习要以理论课为主，习题集只能作为补充以及作为了解学生掌握课堂知识程度的衡量指标。

最后，在新版中附加有医学细胞生物学基本英语词汇。我们认为这些都是最基础的，掌握这些词汇可以帮助阅读英文原版细胞生物学以及有关的专业学术论文，更为重要的是，与一般的词汇表不同，这些词汇注有国际音标，对学生练习专业细胞生物学口语应有很大的帮助。

章静波

2009年8月

目 录

第一部分 实验指导	1
第一章 显微镜技术	1
实验一 普通显微镜的构造及使用方法	1
实验二 相差显微镜的构造及使用方法	6
实验三 荧光显微镜的构造及使用方法	8
实验四 透射电子显微镜的构造及使用方法	10
实验五 扫描电子显微镜的构造及使用方法	15
第二章 光镜标本制作技术	20
实验六 石蜡切片制作与 HE 染色	20
实验七 冰冻切片制作与 NOS 染色	23
实验八 小肠外纵肌层整装铺片标本制作与乙酰胆碱酯酶染色	25
第三章 细胞结构与成分的显示技术	28
实验九 细胞中 DNA 和 RNA 的显示	28
实验十 细胞中过氧化物酶的显示	34
实验十一 细胞中碱性蛋白的显示	36
实验十二 细胞中线粒体的活体染色	39
实验十三 细胞中液泡系的活体染色	41
实验十四 细胞中糖原和脂类的显示	43
实验十五 细胞中溶酶体的显示 (酸性磷酸酶)	47
实验十六 细胞中微丝的染色及形态观察	50
实验十七 微管的间接免疫荧光显示与观察	54
实验十八 中间丝的间接免疫荧光显示与观察	57
第四章 细胞生理	60
实验十九 细胞的吞噬活动	60
实验二十 细胞的运动	63

实验二十一 细胞膜的通透性测定	65
实验二十二 细胞膜片钳技术	68
第五章 细胞培养与分析	76
实验二十三 细胞的原代培养	76
实验二十四 细胞的传代培养	80
实验二十五 细胞的冻存与复苏	82
实验二十六 培养细胞的形态观察和计数	85
实验二十七 细胞显微测量技术	89
实验二十八 培养细胞生长曲线的绘制和分裂指数的测定	91
实验二十九 细胞集落形成实验	94
实验三十 MTT 对细胞生长状况的检测	97
实验三十一 细胞周期的同步化实验	99
实验三十二 流式细胞仪检测细胞周期	101
实验三十三 骨髓间充质干细胞的培养及其体外诱导分化	104
实验三十四 器官培养	106
第六章 细胞成分的分离与分析	109
实验三十五 差速离心法分离细胞器	109
实验三十六 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	112
实验三十七 蛋白质的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	115
实验三十八 蛋白质印迹技术	121
实验三十九 免疫沉淀法	123
实验四十 DNA 提取及检测	126
实验四十一 RNA 提取及检测 (Trizol 法)	130
第七章 细胞工程基础技术	133
实验四十二 鸡血细胞的融合	133
实验四十三 染色体提前凝集标本的制备	136
实验四十四 单克隆抗体的制备	139
实验四十五 显微注射技术 (核移植)	144
实验四十六 DNA 转染实验 (绿色荧光蛋白)	146
第八章 细胞凋亡的测定	155
实验四十七 凋亡细胞的荧光显微镜下形态观察	155
实验四十八 凋亡细胞的电镜下形态观察	158
实验四十九 凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳检测——DNA 梯状条带	160

实验五十 凋亡细胞的单细胞凝胶电泳检测	162
实验五十一 凋亡细胞的原位末端标记法检测	164
实验五十二 凋亡细胞的流式细胞法检测	167
实验五十三 磷脂酰丝氨酸外化的流式细胞术分析	168
第九章 染色体技术	171
实验五十四 染色体标本制备	171
实验五十五 染色体显带技术	174
实验五十六 性染色质的制备	180
实验五十七 姐妹染色单体交换实验	183
实验五十八 染色体原位杂交技术	185
第十章 分子细胞生物学技术	190
实验五十九 DNA 印迹技术	190
实验六十 RNA 印迹技术	194
实验六十一 原位 PCR 技术	197
实验六十二 荧光定量 PCR 技术	201
实验六十三 RNA 干扰技术	205
实验六十四 基因芯片及其应用	209
实验六十五 用 GST pull-down 技术检测蛋白质-蛋白质相互作用	211
第二部分 习题集	215
第一章 绪论	215
第二章 细胞的概念与分子基础	220
第三章 细胞生物学的研究方法和手段	225
第四章 细胞膜与物质的跨膜运输	229
第五章 细胞的内膜系统与囊泡转运	234
第六章 线粒体与细胞的能量转换	237
第七章 细胞骨架与细胞的运动	242
第八章 细胞核	247
第九章 基因信息的传递与蛋白质合成	251
第十章 细胞连接与细胞黏附	255
第十一章 细胞外基质及其与细胞的相互作用	259
第十二章 细胞的信号转导	264
第十三章 细胞分裂与细胞周期	268

第十四章 生殖细胞与受精	277
第十五章 细胞分化	280
第十六章 细胞衰老与细胞死亡	284
第十七章 干细胞和组织的维持和再生	288
第十八章 细胞工程	293
附录一 生物信息学在细胞生物学研究中的应用	298
第一节 生物信息学概论及生物信息数据库	298
第二节 核酸数据分析	306
第三节 蛋白质数据分析	312
附录二 医学细胞生物学基本英语词汇	317
参考文献	354

第一部分 实验指导

第一章

显微镜技术

实验一 普通显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 了解普通显微镜的构造及成像原理。
2. 熟悉油镜的使用方法。
3. 掌握低倍镜、高倍镜的正确使用方法。

【实验原理】

显微镜的主要部件是物镜和目镜，均为凸透镜。物镜的焦距短，目镜的焦距较长。物镜到被观察物 AB 的距离稍大于物镜的焦距，通过物镜得到倒立的放大的实像 $A'B'$ 。 $A'B'$ 对目镜来说是物体，使 $A'B'$ 位于目镜的焦点以内，这样通过目镜就得到 $A'B'$ 的放大的虚像 $A''B''$ 。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，所以用显微镜可以看清非常微小的物体（图1-1）。

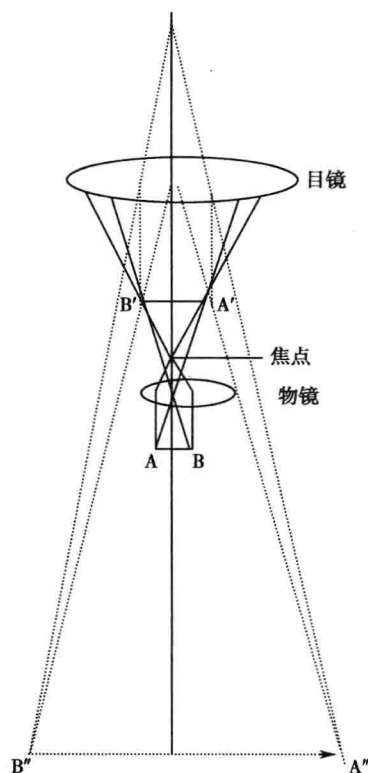


图 1-1 普通显微镜成像光路图

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
a 字片	4 张
红绿羊毛交叉片	4 张
人血涂片	4 张
双层油镜瓶	1 瓶
擦镜纸 (剪成 2cm × 3cm 大小)	1 培养皿
普通显微镜	4 台

【分组形式】

4 人一组。

【操作步骤】

(一) 普通显微镜的主要构造

普通显微镜由三部分组成：机械部分、照明部分和光学部分 (图 1-2)。

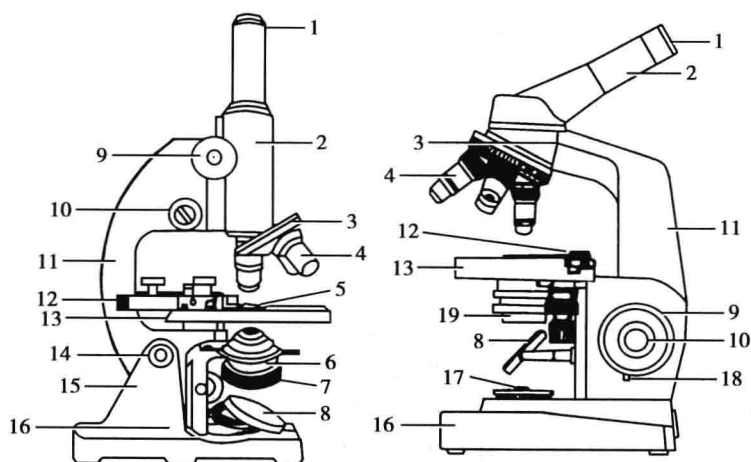


图 1-2 普通显微镜

(左图为直立式镜筒，右图为倾斜式镜筒)

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. 照明装置；
18. 粗调限位钮；19. 滤光片

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，前者又有直立式和倾斜式两种，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，可向任意方向转动，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) 聚光镜：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亮的强弱。

(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，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：160/0.17（mm）（表 1-1）。

表 1-1 不同倍数物镜的比

镜头	放大倍数	镜身	数值孔径	工作距离（mm）
低倍镜	10×	短	0.25	5.40
高倍镜	40×	较长	0.65	0.39
油镜	100×	最长	1.25	0.11

数值孔径 (numerical aperture, NA) 又称镜口率, 反映该物镜分辨力的大小, 数字愈大, 分辨力愈高。分辨力是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力, 可分辨的最小间隔距离越近, 分辨力越高。人的分辨力可达 0.1mm , 显微镜的分辨力能达到 $0.2\mu\text{m}$ 。

$$R = 0.61\lambda/NA \quad NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$$

R 为分辨力, λ 为光波波长, NA 为数值孔径, n 为介质折射率, α 为透镜视锥顶角, 折射率大的介质 (例如: 香柏油的折射率为 1.515, 空气的折射率为 1) 分辨力也大。

工作距离是指物像调节清楚时物镜下表面与盖玻片上表面之间的距离; 物镜的放大倍数越大, 工作距离越小 (图 1-3)。

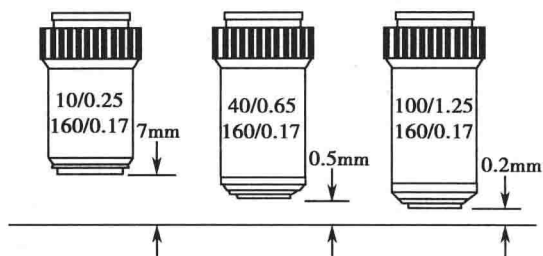


图 1-3 不同倍数物镜的工作距离

(二) 普通显微镜的使用方法

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, 显微镜离实验台边缘应有至少一拳的距离。

(2) 对光: 转动粗调节器, 使镜台下降 (镜筒直立式显微镜需升高镜筒), 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 (转动时听到咔哒声时, 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, 然后使低倍镜对准镜台, 开大光圈, 上升聚光器并调节光亮调节钮至视野内光线明亮适中。

(3) 放置标本片: 取标本片, 盖玻片面朝上放在镜台上, 用玻片移动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头, 同时转动粗调节器, 使镜台上升 (镜筒直立式显微镜下降镜筒) 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 (镜筒直立式显微镜上升镜筒) 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: 必须先先在低、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 1 滴香柏油, 然后

从侧面注视着镜头与玻片，慢慢转换油镜使镜头浸入油中。

(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，一边稍稍调节细螺旋器，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：使用完毕，先用擦镜纸滴少许二甲苯将镜头上和标本上的香柏油擦去，再用干净擦镜纸轻轻擦干净。

(三) 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。注意观察物像是反是正，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，注意分辨红绿羊毛的上下位置关系（利用细螺旋升降镜台进行判断）。

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力并练习擦拭油镜头和标本片。

【观察与记录】

1. a 字片在低倍镜下呈倒立的物像，且玻片的移动方向与视野内物像移动的方向相反。

2. 红绿羊毛交叉片在高倍镜下，逆时针上升镜筒时红色羊毛清晰，表明红色羊毛位于交叉点上方，顺时针下降镜筒时，绿色羊毛清晰，绿色羊毛在交叉点的下方。

3. 观察人血细胞涂片时，低倍镜、高倍镜、油镜对标本的观察范围依次减小，但放大倍数、分辨力依次增强。以中性粒细胞为例：低倍镜下只见细胞中央有被染成紫色的核物质，高倍镜下可见其核为分叶状，细胞质中具有大小不等的颗粒。油镜下颗粒更大、更清晰。

【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，应先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，切忌手持物镜移动。

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。

(邵红莲)

实验二 相差显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

- 1. 了解相差显微镜的构造及工作原理。
- 2. 熟悉相差显微镜的正确使用方法。

【实验原理】

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。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，光波通过时，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。

【实验器材和试剂】

器材、试剂	每组学生所需数量
HeLa 细胞	1 培养瓶
相差显微镜	1 台

【分组形式】

6 人一组。

【操作步骤】

（一）相差显微镜的构造

相差显微镜（图 1-4）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，用带相板的物镜代替普通物镜，并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑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。其作用是将直射光所形成的像从一些衍射像中分出来。相板安装在物镜的后焦面处,相板除能推迟直射光线或衍射光线的相位外,还能吸收光使亮度发生变化。调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时,聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上,必须调节光阑的亮环和相板的环状圈重合对齐,才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱,应被吸收的光不能吸收,该推迟相位的光波不能推迟,就失去了相差显微镜的作用。

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(图1-5)。倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope)常用于观察培养瓶或培养板中的活细胞。

(二) 倒置相差显微镜的使用

1. 打开光源,一般在环状光阑下面选择绿色滤光片置于光路中,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,能使相差显微镜观察获得良好的效果。此滤光片放置好后一般不再每次更换。

2. 合轴调整 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(图1-4,右侧)。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。

3. 调焦旋转物镜转换器,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。使用过程必须使环状光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应。例如:使用 $40\times$ 相差物镜,应选用 $40\times$ 标示孔的光阑。

(三) 倒置相差显微镜使用练习

观察培养瓶或培养板中的 HeLa 细胞。

【观察与记录】

在倒置相差显微镜下观察活细胞,可清楚地分辨细胞的形态、细胞核、核仁以及胞质中存在的颗粒状结构。

【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。

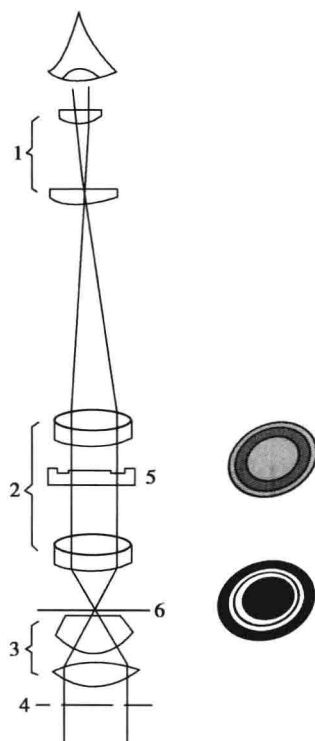


图1-4 相差显微镜光路图示

1. 目镜; 2. 物镜; 3. 聚光器;
4. 环状光阑; 5. 相板; 6. 标本

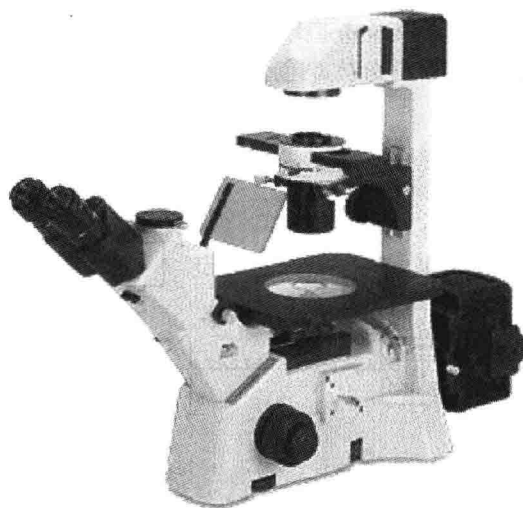


图1-5 倒置相差显微镜

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。

(邵红莲)

实验三 荧光显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 了解荧光显微镜的构造及工作原理。
2. 熟悉荧光显微镜的正确使用方法。

【实验原理】

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；而且每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长，因此要观察不同荧光应选用不同波长的激发光。

2. 荧光显微镜原理 荧光显微镜利用一个高发光效率的点光源，经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光，激发光激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后再通过物镜和目镜的放大进行观察。

图 1-6 是目前常用的落射式荧光显微镜的光路图，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° 的双色束分离器从物镜向下落射到标本表面，样品被激发生产生的荧光以及由物镜、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、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（图 1-7）。

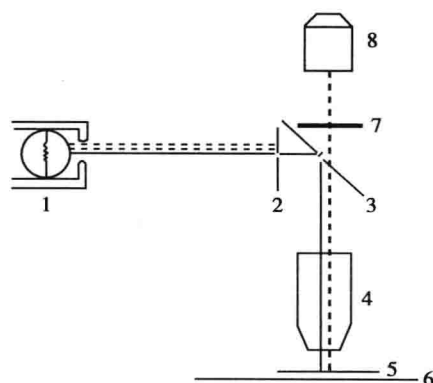


图 1-6 落射式荧光显微镜光路图

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

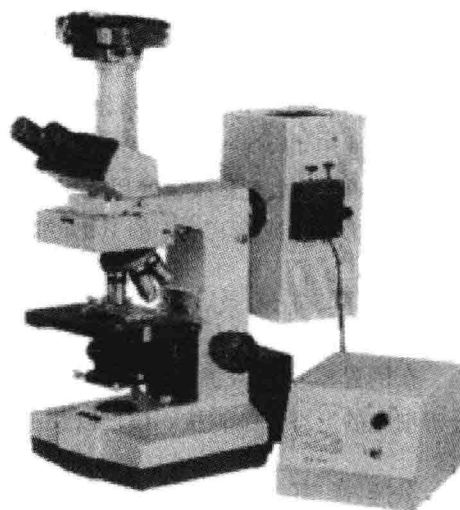


图 1-7 落射式荧光显微镜