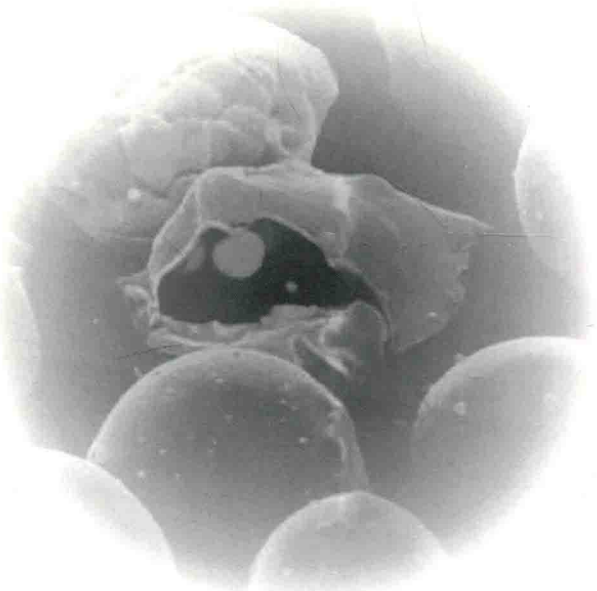
生命科学核心课程系列教材

细胞生物学实验

Experiments of Cell Biology

（第二版）

李　芬　胡海燕　主编



科学出版社

生命科学核心课程系列教材

细胞生物学实验

（第二版）

李　芬　胡海燕　主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是作者根据多年教学实践并采纳第一版使用过程中的意见和建议编写而成，是细胞生物学教学改革的主要成果，从基础性、综合性和设计性3个层面设置实验37个。涵盖了部分经典的细胞生物学实验，增添了一些现代细胞和分子生物学新技术，内容包括光学及电子显微镜技术，细胞形态结构，细胞化学及组分分离，细胞分裂与早熟染色体凝集，细胞培养、冻存、复苏及融合，转染，荧光原位杂交，免疫印迹，免疫荧光，酵母双杂，细胞同步化及凋亡的诱导和检测等。

本书可供综合性大学，农林、师范及医学院校生命科学相关专业本科生使用，也可作为相关研究人员的参考书。

图书在版编目（CIP）数据

细胞生物学实验 / 李芬，胡海燕主编. —2 版. —北京：科学出版社，2015
生命科学核心课程系列教材
ISBN 978-7-03-043225-4

I. ①细… II. ①李… ②胡… III. ①细胞生物学–实验–高等学校–教材
IV. ①Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2015）第 020981 号

责任编辑：席 慧 / 责任校对：郑金红
责任印制：霍 兵 / 封面设计：迷底书装

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
北京华正印刷有限公司印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2007 年 9 月第 一 版 开本：787 × 1092 1/16
2015 年 3 月第 二 版 印张：14
2015 年 3 月第十次印刷 字数：331 000
定价：35.00 元
（如有印装质量问题，我社负责调换）

编写委员会名单

主　编　李　芬（河南师范大学）

胡海燕（河南科技学院）

副主编　杨献光（河南师范大学）

王改平（河南师范大学）

杨军英（河南师范大学）

编　者　（按姓氏笔画排序）：

王改平（河南师范大学）

刘洪梅（河南师范大学）

李　芬（河南师范大学）

杨军英（河南师范大学）

杨献光（河南师范大学）

胡海燕（河南科技学院）

余炎炎（信阳师范学院华锐学院）

张国平（广州医科大学）

姬生栋（河南师范大学）

前　言

细胞生物学是高等院校生命科学的主要课程之一，是一个实验性很强的学科。生命科学的许多重大发现源于细胞生物学实验技术的不断创新。因此，学习和掌握细胞生物学基本技术和最新实验方法，对于从事生命科学研究的工作者来说是非常必要的。

细胞生物学实验课的教学目的主要是，通过基本技能训练及观察分析实验结果，使学生了解并掌握有关的实验技术原理和操作方法，进而培养学生动手实践、分析和解决问题的能力。相关的细胞生物学实验教材有很多，但如果考虑到设备条件、师资力量和学生情况，从适合地方普通高等院校的角度来说，找一本合适的教材并不容易，为此，我们在参考兄弟院校反馈意见的基础上，对 2007 年出版的《细胞生物学实验技术》一书进行了改版，对保留的大部分实验进行了必要的扩充和修改，同时将一些实验进行了合并，也增添了一些新的实验，力求在加强学生基本技能训练的同时，提高学生分析问题和解决问题的科学思维能力，为将来学生独立进行科学研究打下基础。

本书适应新的实验教学体系，实验内容少而精，适合普通高等院校细胞生物学实验教学，可以留给老师和学生一定的发挥空间。本书在内容的安排上，分为基础性实验、综合性实验和设计性实验 3 个层次，涵盖了细胞生物学大部分内容，既有前沿性，又有实用性。其突出的特点是力求全面培养和提高学生的实验技能，使学生在加深对细胞生物学相关理论知识的认识、掌握基本细胞生物学实验技术和方法的基础上，学习从事科学研究和撰写科研论文的基本方法，为其将来独立从事科研工作奠定坚实的基础。每个实验均有详细的原理介绍、结果描述、必要插图、注意事项及思考题，有助于学生在实验前后进行思考、总结和提高。同时配 PPT，方便教师讲授和学生预习。

本书涉及的大多数材料为生活细胞材料，由学生自己动手取材和实验，能使学生对细胞有生动的认识。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、分析问题的能力、解决问题的能力和独立从事科学研究的能力很有帮助。书后有 6 个附录，为读者查询常用实验数据提供了方便，实用性强。本书可供高等师范院校生物科学和生物技术专业及相关专业的学生和教师使用。

本书插图部分选自各家书刊，部分由作者拍摄及自绘，引用插图大多都注明版权，对于少数未查明来源的图片作者在此表示一并感谢。

本书采用集体讨论、分别执笔的方式编写，主编负责全书的通稿和安排。其中，实验 2、实验 5、实验 6、实验 20 至实验 23 和附录一、附录二由杨献光编写；实验 10、实验 17、实验 19、实验 28、实验 30、实验 32、实验 34 由王改平编写；实验 8、实验 9、实验 11 至实验 13、实验 25、实验 26 和附录五、附录六由杨军英编写；实验 1、实验 3、实验 14 至实验 16 和附录三、附录四由刘洪梅编写。由于水平有限，不足之处在所难免，敬请批评指正。

主　编

2014 年 11 月

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com

实验室规则

一、每次实验前必须充分预习实验讲义，回顾与实验相关的理论知识，以便充分了解实验的目的、原理和方法，避免发生错误，提高实验效果。

二、遵守实验纪律，按时到达实验室，不得迟到或早退。实验中途因故需外出时应向任课教师请假，进入实验室之前要换好实验服。

三、保持实验室安静，不许在实验室内喧哗及随意走动。

四、必须严肃认真地进行实验，严格按照操作规程进行，实验期间不得进行任何与实验无关的活动。

五、实验室内各组仪器及器材由各组自己使用，不得互相调换。要爱护仪器、标本和设备。如遇仪器损坏或不灵，应及时报告任课教师，以便修理或更换，不要自行乱修。损坏器材或设备者应按有关规定进行赔偿。

六、注意节约实验材料、药品和水、电等。

七、保持实验室内清洁整齐。实验结束后，各组必须认真清理各自的实验台面，将器材清洗后点清数目，然后摆放整齐。班级值日生负责清扫室内卫生，关好水、电开关和门、窗等，经任课教师允许后方可离开实验室。

八、动物尸体、纸片及实验废物应放到指定地点，不得随意乱丢。

九、实验作业为平时考查的内容之一，故应认真对待，不得草率从事，应按照各实验的要求及时完成。

十、有不遵守上述要求者，任课老师将终止其实验，并取消其当堂实验成绩。

细胞生物学实验绘图方法与要求

一、在仔细观察的基础上，选择典型结构进行描绘，绘图过程中应注意各部分结构的比例关系，真实、准确地描绘出相应的结构。

二、一律用铅笔绘图，线条要明确清晰，结构的深浅明暗一律以点的疏密来表示，点要圆且大小、深度一致，不得涂暗影或进行其他美术加工。

三、各部分结构名称要在一侧引直线注明，且各引线要平行不得交叉。

四、绘制观察到的细胞结构示意图，必须标注使用的显微镜和放大倍数。

五、绘图时每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当并注意纸面的整洁美观。

六、图注中应简要注明处理方法。

目　录

前言
实验室规则
细胞生物学实验绘图方法与要求

第一部分　基础性实验

实验 1　普通光学显微镜的构造及使用……1
实验 2　特殊光学显微镜的构造及使用……7
Ⅰ　暗视野显微镜……7
Ⅱ　相差显微镜……11
Ⅲ　荧光显微镜……14
Ⅳ　激光扫描共聚焦显微镜……18
实验 3　石蜡切片法制备光学显微镜标本……23
实验 4　冰冻切片法制备光学显微标本……31
实验 5　透射电子显微镜及样品制备……35
实验 6　扫描电子显微镜及样品制备……41
实验 7　细胞形态观察、大小测量及死细胞和活细胞鉴定……45
实验 8　液泡系的超活染色与动态观察……49
实验 9　线粒体超活染色技术与数目统计……54
实验 10　细胞骨架观察……59
Ⅰ　微丝观察……59
Ⅱ　微管观察……62
实验 11　碱性磷酸酶和酸性磷酸酶染色技术……65
实验 12　核仁组成区银染色技术（Ag-NOR 染色法）……69
实验 13　多糖的细胞化学显示法——PAS 反应……73
实验 14　DNA 的细胞化学显示法——Feulgen 反应……79
实验 15　RNA 的细胞化学显示法——Brachet 反应……82
实验 16　细胞器的分离与鉴定……85
实验 17　基因组 DNA 的提取与检测……89
Ⅰ　动物细胞基因组 DNA 提取……89
Ⅱ　植物细胞基因组 DNA 提取……91
Ⅲ　基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳……94
实验 18　真核细胞总 RNA 提取与检测……97
Ⅰ　TRIzol 试剂提取小鼠肝脏总 RNA……98

Ⅱ 热酸性酚法提取酵母总 RNA ……98
实验 19 细胞无丝分裂和有丝分裂的形态观察 ……101
实验 20 细胞减数分裂的形态观察 ……105
实验 21 超前凝集染色体标本的制备与观察 ……110
实验 22 细胞的原代培养 ……113
实验 23 细胞的传代培养 ……116
实验 24 细胞的冻存与复苏 ……119
实验 25 细胞融合实验 ……122
实验 26 流式细胞仪测定细胞 DNA 含量 ……127

第二部分 综合性实验

实验 27 冠状动脉平滑肌细胞的分离、培养、鉴定与生长曲线绘制 ……133
实验 28 荧光原位杂交确定特定核酸序列的定位 ……138
实验 29 磷酸钙沉淀法将 DNA 导入细胞 ……142
实验 30 RT-PCR 检测大鼠肝再生中肌动蛋白基因的表达 ……145
实验 31 Western blot 检测 HeLa 细胞 Hsp70 表达 ……151
实验 32 重组 EGFP 在小鼠肝脏中瞬时表达的观察（液压转基因法） ……156
实验 33 蛋白质与蛋白质相互作用检测——酵母双杂交筛选 ……160

第三部分 设计性实验

实验 34 不同类群细胞大小和结构的比较 ……166
实验 35 植物细胞中叶绿体的原位观察 ……170
实验 36 不同方法制备同步化细胞的效果比较 ……173
实验 37 细胞凋亡的诱导和检测 ……176

参考文献 ……181
附录 ……185
附录一 离心机转数与离心力的换算表 ……185
附录二 常用溶液的配制和使用 ……187
附录三 生物标本常用染料性能简介和常用染色剂配方 ……203
附录四 常用玻璃、塑料仪器的清洗和干燥 ……208
附录五 试剂规格 ……212
附录六 常用单位 ……214
彩图

第一部分　基础性实验

实验 1

普通光学显微镜的构造及使用

【实验目的】

1. 熟悉普通光学显微镜的基本构造和性能。
2. 掌握普通光学显微镜的正确使用方法。

【实验原理】

一、普通光学显微镜的基本构造

普通光学显微镜是最常用的一种光学显微镜，主要由机械系统和光学系统组成（图 1-1）。

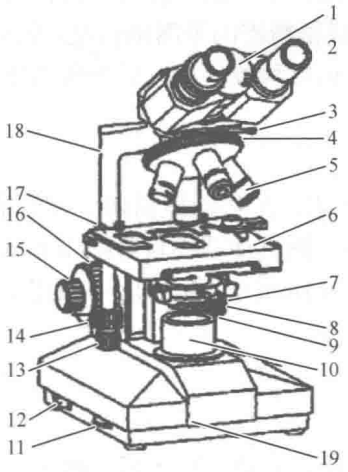


图 1-1　普通光学显微镜结构示意图

1. 目头；2. 目镜；3. 镜头固紧螺钉；4. 物镜转换器；5. 物镜；6. 载物台；7. 聚光镜升降旋钮；8. 聚光镜固紧螺钉；9. 聚光镜（带光圈）；10. 下聚光镜；11. 亮度旋钮；12. 电源开关；13. 推动器横向移动旋钮；14. 推动器纵向移动旋钮；15. 细调旋钮；16. 粗调旋钮；17. 标本夹；18. 镜臂；19. 镜座

（一）机械系统

机械系统是显微镜的重要组成部分，其作用是固定与调节光学镜头、固定与移动标本等，主要由镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器与调焦装置组成。

1. 镜座

镜座是显微镜的基本支架，它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒，它是用来安装光学系统部件的基础。

2. 镜筒

镜筒是位于镜臂前方的圆筒，上端安装目镜，下端连接物镜转换器。根据镜筒的数目，光镜可分为单筒式和双筒式，单筒式又分为直立式和倾斜式两种，而双筒式的镜筒均为倾斜式，现代光学显微镜大多为双筒式。

从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。物镜的放大率是相对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度发生变化，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，不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

3. 物镜转换器

物镜转换器位于镜筒下端，是一个可以转动的圆盘，一般有 3～4 个物镜接口用以安装放大倍数不同的物镜。转动物镜转换器，可以按需要将其中的任何一个物镜和镜筒接通，与镜筒上面的目镜构成一个放大系统。

4. 载物台

载物台也称镜台，位于镜筒的下方，方形或圆形，用于放玻片标本。载物台中央有一孔，为光线通路。在载物台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用为固定或移动标本，使得镜检对象恰好位于视野中心。

5. 推动器

推动器是移动标本的机械装置，由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成，好的显微镜在纵、横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。如果需要重复观察标本的某一部分，在第一次检查时，可记下纵、横标尺的数值，以后按数值移动推动器，就可以找到原来标本的位置。

6. 调焦装置

调焦装置一般位于镜臂的下端，是移动镜筒调节物镜和标本间距离的机件，包括粗调旋钮和细调旋钮。粗调旋钮旋转一圈可使载物台升降 10mm，一般用于低倍镜调焦。细调旋钮每转一圈可使载物台缓慢升降 0.1mm（100μm），一般用于高倍镜、油镜和分辨物像清晰度调焦。

（二）光学系统

普通光学显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、物镜、目镜等组成。聚光器、物镜、目镜各自相当于一个正透镜，显微镜的光学系统就是根据透镜成像的原理对微小物体进行放大的。其基本成像原理：被检物放在聚光器和物镜之间，光线通过物镜在镜筒中形成一个倒立的放大实像，目镜又将此倒立实像进一步放大成倒立虚像，通过调焦装置使此虚像落在人眼

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com

的明视距离（250mm）处，即倒立虚像通过眼球后，在视网膜上形成正立实像，此实像与倒立虚像相吻合（图 1-2）。

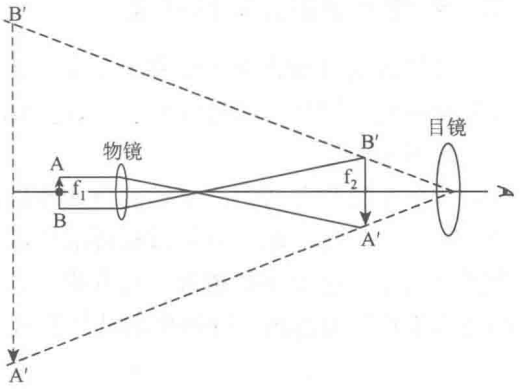


图 1-2　显微镜成像原理图

1. 反光镜

反光镜位于镜座上，是一个可以随意转动的双面镜。一面为平面，一面为凹面，其作用是将从任何方向射来的光线反射到聚光器透镜的中央，照明标本。平面镜反射光线的能力较弱，在光线较强时使用；凹面镜反射光线的能力较强，在光线较弱时使用。较新的高档光学显微镜镜座上装有光源，并有电流调节旋钮，可通过调节电流大小调节光照强度。

2. 聚光器

聚光器在载物台下面，由聚光镜、光圈和升降旋钮组成。其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以用升降旋钮调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处，而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm。因此，要求使用的载玻片厚度为 0.8～1.2mm，否则被检样品不在焦点上，影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有可变光阑，也称光圈，位于聚光镜的下方，由十几张金属薄片组成，中心部分形成圆孔。其作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应。可变光阑开得越大，数值孔径越大。

3. 物镜

物镜安装在物镜转换器上，物镜的性能取决于物镜的数值孔径（numerical apeature，N.A.），每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上，数值孔径越大，物镜的性能越好。

一般根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同，可分为：①干燥系物镜，以空气为介质，如常用的 40× 以下的物镜，数值孔径均小于 1。②油浸系物镜，常以香柏油为介质，此物镜又称油镜头，其放大率为 90×～100×，数值孔径大于 1。各种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	数值孔径（N.A.）	工作距离/mm
低倍镜	10×	0.28	6.50
高倍镜	40×	0.65	0.60
油镜	100×	1.30	0.20

4. 目镜

目镜装在镜筒上端，通常由两块透镜组成，上端的透镜称为接目镜，下端的透镜称为场镜。上下透镜之间或在两个透镜的下方，装有金属制的环状光阑或称视场光阑，物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处，所以其上可安置目镜测微尺。一般在目镜的侧面刻有放大倍数，如 5×、10×、15× 等，最常用的是 10× 目镜。

二、普通光学显微镜的性能

显微镜的性能指标主要有分辨率、放大率、焦点深度、镜像亮度和视场亮度等，这些指标都有一定的限度，彼此间相互作用又相互制约。

1. 分辨率

分辨率又称分辨力，物镜的分辨率即显微镜的分辨率。目镜与显微镜的分辨率无关，物镜分辨率是指能清晰地分辨被检样品中两个物体点的最短距离的能力。这两点之间的距离即为其分辨率，这个距离越近，其分辨率越高。人眼的分辨率可达 0.1mm，而普通光学显微镜的分辨率可达 0.2μm。分辨率的计算公式为

$$R=0.61\lambda/\text{N.A.}$$

$$\text{N.A.}=n\sin(\alpha/2)$$

式中，R 为分辨率；λ 为照明光线波长；N.A.为物镜数值孔径；n 为介质的折射率；α 为透镜的孔径角。照明光线波长越短，物镜的数值孔径越大，显微镜的分辨率越大。

2. 放大率

放大率也称为放大倍数。显微镜的总放大率等于目镜和物镜放大率的乘积。物镜放大率是相对一定镜筒长度而言的，镜筒长度的变化，不仅导致放大率发生变化，而且成像质量也受到影响。适宜的总放大率是所用物镜数值孔径的 500～1000 倍，在此范围内称为有效放大率。如果高于上述范围，微细结构分辨不清，为空的放大。低于上述范围时由于放大率过低，难以观察。

3. 焦点深度

当显微镜对被检样品的某一点或平面准焦时，影像的清晰范围，不局限于这一点或面，在其上下的一定距离或深度内也是清晰的。这段清晰的距离或深度，就称为焦点深度，简称焦深。显微镜的焦深可变，它与物镜的数值孔径和总放大率成反比。因此高放大率和高数值孔径的显微镜焦深就浅，需边观察边调节焦距，才能看到标本的全厚度。

4. 镜像亮度和视场亮度

镜像亮度是指显微镜下图像的明暗程度，其数值与物镜的数值孔径的平方成正比，与总放大率成反比。视场亮度是指显微镜下整个视场的明暗程度。视场亮度不仅与目镜、物镜有关，还受聚光器、可变光阑和光源等因素的影响。在不更换物镜和目镜的情况下，视场亮度越大，镜像亮度也越大。

【实验材料】

人口腔黏膜上皮细胞装片。

【实验试剂】

香柏油、二甲苯。

【实验器材】

普通光学显微镜、擦镜纸。

【实验步骤】

取人口腔黏膜上皮细胞装片练习普通光学显微镜的使用操作及注意事项。

一、观察前的准备

（1）取显微镜时，应用右手紧握镜臂，左手托住镜座，平稳地将显微镜放到实验台上。

（2）显微镜一般放在身体的左前方，离桌子边缘约 10cm，右侧可放记录本或绘图纸。

（3）调节光照：将10×物镜转入光孔，聚光器上的光圈开到最大位置，左眼观察目镜中视野的亮度，转动反光镜，使视野的光照达到明亮均匀为止。自带光源的显微镜，可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

（4）调节光轴中心：在观察时，显微镜光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴在同一条直线上。带视场光阑的显微镜，先将光阑缩小，用 10×物镜观察，在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像，如此像不在视场中央，可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央，然后缓慢地将视场光阑打开，若能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接，则说明光线已经合轴。

二、低倍镜观察

镜检标本时需先用低倍镜观察。因为低倍镜视野较大，易于发现目标和确定检查的位置。标本装片置于载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本位于物镜正下方，转动粗调旋钮，使物镜调至接近标本处，用目镜观察，同时旋转粗调旋钮慢慢升起镜筒（或下降载物台），直至物像出现，再用细调旋钮调焦使物像清晰。用推动器移动标本装片，找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

三、高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜，低倍镜头、高倍镜头是同焦的，在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调旋钮，使载物台上升（或镜筒下降），直至物像出现，再用细调旋钮调至物像清晰为止，找到需观察的部位，并移至视野中央进行观察。

四、油镜观察

油浸物镜的工作距离（指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离）很短，一般在 0.2mm 以内，使用油浸物镜时要特别细心，避免由于“调焦”不慎而压碎标本装片并使物镜受损。使用油镜按下列步骤操作。

（1）先用粗调旋钮将镜筒提升（或将载物台下降）约 2cm，并将高倍物镜转出。

（2）在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。

（3）从侧面注视，用粗调旋钮将载物台缓缓地上升（或镜筒下降），使油浸物镜浸入香柏油中，使镜头几乎与标本接触。

（4）向目镜内观察，放大视场光阑及聚光镜上的光圈，上调聚光器，使光线充分照明。用粗调旋钮将载物台徐徐下降（或镜筒上升），当出现物像后改用细调旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物像，必须再从侧面观察，重复上述操作。

（5）观察完毕，下降载物台，将油镜头转出，先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用擦镜纸蘸少许乙醚乙醇混合液（乙醚 2 份，无水乙醇 3 份）或二甲苯，擦去镜头上残留的油迹，最

后再用擦镜纸擦拭2～3下即可（注意向一个方向擦拭）。

（6）将各部分还原，转动物镜转换器，使物镜镜头不与载物台通光孔相对，再将镜筒下降至最低，降下聚光器，反光镜与聚光器垂直，用一个干净手帕将目镜罩好，以免目镜镜头沾上灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分，然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

【实验结果】

低倍镜、高倍镜、油镜观察人口腔黏膜上皮细胞时，观察范围依次变小，放大倍数、分辨率依次提高。

【注意事项】

1. 取放显微镜时要轻拿轻放，持镜时要一手握镜臂，另一只手托住镜座，不可单手提取，以免零件脱落或碰撞到其他地方。不可将显微镜放置在实验台边缘，镜筒倾斜角度不要超过45°，以防碰翻落地。

2. 上升载物台、转换物镜时，一定要从显微镜的侧面注视着，以免物镜与标本接触，造成镜头或标本装片的损坏。

3. 转换物镜时应转动物镜转换器，切勿手持物镜移动。

4. 玻片标本待观察部位要正对载物台的通光孔，且不能放反，否则高倍镜和油镜下找不到物像。

5. 粗调旋钮、细调旋钮要配合使用，使用细调旋钮时，用力要轻，转动要慢，细调旋钮不能单方向过度旋转。

6. 切勿任意拆卸显微镜的零件，不要随便取出物镜、目镜。

7. 显微镜使用完毕后，要将玻片取出，下降载物台，转动物镜转换器使镜头离开通光口，竖立反光镜，盖上外罩，放回显微镜柜内。

8. 保持显微镜清洁，避免灰尘、水及化学试剂污染显微镜。光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭，机械部分可以用布擦拭。

【作业】

1. 简述普通光学显微镜光路合轴调中方法。
2. 简述使用低倍镜、高倍镜观察标本的主要步骤。
3. 简述普通光学显微镜的主要性能指标。

【思考题】

1. 为什么在使用高倍镜和油镜时，要从低倍镜开始？
2. 使用油镜时有哪些注意事项？
3. 在观察很多玻片标本时，如何提高观察效率？

实验 2

特殊光学显微镜的构造及使用

表面为曲面的玻璃或其他透明材料制成的光学透镜可以使物体放大成像，光学显微镜就是利用这一原理把微小物体放大到人眼足以观察的尺寸。近代的光学显微镜通常采用两级放大，分别由物镜和目镜完成。被观察物体位于物镜的前方，被物镜作第一级放大后成一倒立的实像，然后此实像再被目镜作第二级放大，成一虚像，人眼看到的就是虚像。显微镜的总放大率就是物镜放大率和目镜放大率的乘积。放大率是指直线尺寸的放大比，而不是面积比。

古典的光学显微镜只是光学元件和精密机械元件的组合，它以人眼作为接收器来观察放大的像。后来在显微镜中加入了摄影装置，以感光胶片作为可以记录和存储的接收器。现在又普遍采用光电元件、电视摄像管和电荷耦合器等作为显微镜的接收器，配以微型电子计算机后构成完整的图像信息采集和处理系统。

自从詹森（Zacharias Jannsen）父子发明显微镜以来，显微镜的发展一直以提高图像的对比度和分辨率为主要目标。在显微镜本身结构发展的同时，显微观察技术也在不断创新，1850 年出现了偏光显微术；1893 年出现了干涉显微术；1935 年荷兰物理学家泽尔尼克（Frits Zernike）创造了相差显微术，为此他在 1953 年获得了诺贝尔物理学奖。此外，还出现了暗视野显微镜、荧光显微镜等多种显微镜类型。这些特殊的光学显微镜能够满足不同的显微观察要求，大大提升了细胞生物学的研究水平。下面介绍几种常用的特殊光学显微镜的原理与使用方法。

Ⅰ　暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark ground microscope）是在普通光学显微镜的基础上改造而来的，它使用暗视野照明法进行观察，在聚光镜中央有一个遮光片，使得照明光线不能直接进入物镜，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的，利用这种显微镜能观察到 4～200nm 的微小粒子，适合观察原生生物鞭毛或纤毛的运动或活细胞中微粒的运动。

【实验目的】

1. 学习暗视野显微镜的原理，了解其构造。
2. 练习暗视野显微镜的使用。

【实验原理】

一、暗视野显微镜设计原理

暗视野显微镜的设计应用了光学上的丁达尔效应（Tyndall effect：在光的传播过程中，当光线照射到粒子时，如果粒子大于入射光波长很多倍，则发生光的反射；如果粒子小于入射光波长，则发生光的散射，这时观察到的是光波环绕微粒而向其四周放射的光，称为散射光）。丁达尔效应就体现了光的散射现象。例如，在黑暗中点亮手电筒，或一束强光斜向照进昏暗的房间，可以从光束的侧面看到一条发亮的光柱，并看到许多原本看不到的微尘颗粒，这就是因为发生了光的散射。清晨，在茂密的树林中，常常可以看到从枝叶间透过的一道道光柱，类似于这种的自然界现象，也是丁达尔效应。

在暗视野显微镜中光的散射是通过一个特殊的聚光器——暗视野聚光器来实现的。由于暗视野聚光器的特殊构造，入射光线在聚光器顶透镜或盖片的上表面发生全反射，不能入射物镜之内，因此显微镜视野是暗的；但是，装片上的样品被入射光斜向照明，并发出散射光。这些被标本散射的光可以进入物镜，通过目镜被检测到。镜检时，因不能直接观察到照明光线，与光轴垂直的平面视场暗黑，在深暗的背景上能清晰地看到由散射光和反射光形成的明亮的物体影像，物像与背景造成极大的反差，使样品更明显。视场内的样品，被斜射光线照明，可从样品各种结构表面散射和反射光线，因此镜检时可以看到许多细胞器的明亮轮廓，如细胞核、线粒体、液泡及某些内含物等，能够观察到 4～200nm 的微粒子的存在和运动，但不能看清其内部结构。

二、暗视野显微镜的特殊构造

为了实现显微镜的暗视野，需采用特殊构造即暗视野聚光器，常用的暗视野聚光器有两种：抛物面聚光器和心形聚光器。本实验主要介绍抛物面聚光器。在这种特殊的聚光器中，聚光镜和光阑都具有特殊的构造。聚光镜为抛物面体，上下为与光轴垂直的平面；光阑中央为较大的圆形暗视野光档，遮住照明光束中央部分的光线，使之不能进入物镜，从而得到暗的视野。外周为环状的透光光阑，可使入射光为一个光环，如图 2-1 所示。入射的光环经抛物面聚光镜反射，会聚于样品处，斜向照亮样品，样品被照明并射出反射光和散射光，进入光路被检测到，呈现为明亮的物体。

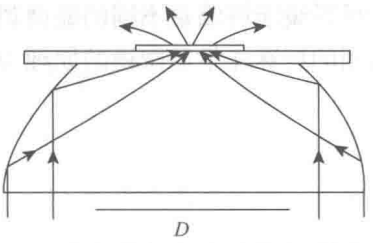


图 2-1　抛物面聚光器及其光路
入射光发生全反射，样品被照明并射出反射光和散射光，进入物镜被观察到

暗视野聚光器是暗视野显微镜的专用附件，普通光学显微镜的普通聚光器更换为暗视野聚光器可变为暗视野显微镜。在使用暗视野聚光器时要注意选择与物镜的数值孔径合理匹配的聚光器，载玻片的适宜厚度为 0.8～1.2mm，并且有足够强的照明强度。

三、自己动手制作暗视野显微镜

暗视野显微镜与普通光学显微镜的区别主要在于照明方法，即暗视野显微镜采用的是暗视野照明方式。除了暗视野聚光器法以外，中心遮光法也可以实现暗视野照明。

中心遮光法就是用暗视野光档（dark field stop）遮去中央光束，然后将这样的圆形光档

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com