



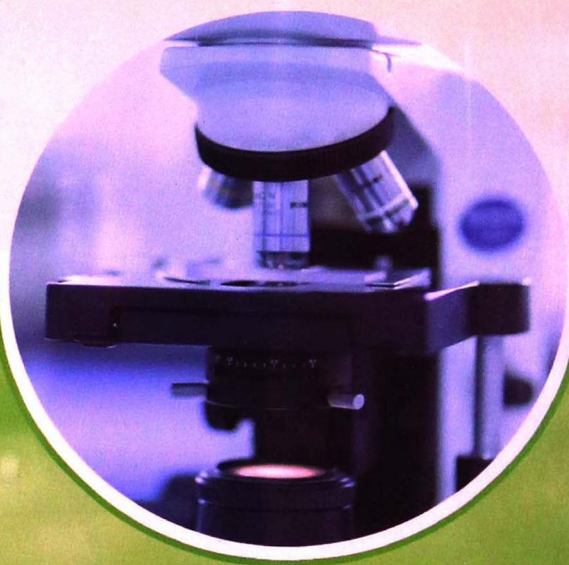
普通高等教育“十二五”规划教材
能力培养型生物学基础课系列实验教材

细胞生物学实验教程

(第三版)

CELL BIOLOGY
EXPERIMENT

安利国 邢维贤 主编



科学出版社

能力培养型生物学基础课系列实验教材

细胞生物学实验教程

(第三版)

安利国 邢维贤 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面上设置实验项目,突出综合能力和创新能力的培养。基础性实验包括细胞的观察技术、细胞化学、细胞的分离与活性检测、细胞增殖与细胞培养内容,共计20个实验,是细胞生物学中最基本、最代表本学科特点的实验方法和技术。综合性实验包括细胞融合、人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备、细胞转染、细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、小鼠胚胎干细胞的分离和培养、细胞信号转导8个实验,是多技术和多层次的综合性实验,实验难度较大。此外还提供了7个研究性实验题目供学生开展创新性实验时参考。

本书是高等院校细胞生物学实验教材,适用于综合性大学、师范院校、农林院校和医学院校生物科学、生物技术及其相关专业的学生使用,也可供其他专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程 / 安利国,邢维贤主编. —3
版. —北京: 科学出版社,2015.6
能力培养型生物学基础课系列实验教材
ISBN 978-7-03-044640-4

I. ①细… II. ①安… ②邢… 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 124613 号

责任编辑: 陈 露
责任印制: 谭宏宇 / 封面设计: 殷 靓

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>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年9月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
2015年6月第 三 版 印张: 6 1/2
2015年6月第十二次印刷 字数: 126 000

定价: 24.00 元

能力培养型生物学基础课系列实验教材 第三版编委会

主任委员：安利国

副主任委员：郭善利 徐来祥 孙虎山 黄 勇

委 员：(以姓氏笔画为序)

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 王洪凯 | 朱道玉 | 刘林德 | 刘顺湖 |
| 刘淑娟 | 安利国 | 孙虎山 | 李师鹏 |
| 李荣贵 | 林光哲 | 姚志刚 | 徐来祥 |
| 郭善利 | 黄 勇 | 曹 慧 | 焦德杰 |

《细胞生物学实验教程》第三版编写人员

主 编：安利国 邢维贤

副主编：尹 苗 杨桂文

编 者：(以姓氏笔画为序)

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 王晓强 | 尹 苗 | 邢维贤 | 刘慧莲 |
| 闫华超 | 安利国 | 孙振兴 | 李玉玺 |
| 李学红 | 杨桂文 | 肖 军 | 张 明 |
| 张福森 | 庞秋香 | 孟小倩 | 徐承水 |
| 黄 玲 | 崔龙波 | 康美玲 | 廉玉姬 |

第三版前言

细胞生物学是一门实验性学科,其诞生和发展是以实验仪器的发明和实验技术的改进为基础的。如果没有显微镜的发明,人们用肉眼不可能发现体积小于人眼分辨率 10 倍的微小细胞;如果没有各种细胞染色技术的产生,人们不可能观察到无色透明的细胞内的显微结构;如果没有电子显微镜的出现,人们不可能了解细胞内部的超微结构;如果没有显微操作技术的成熟,人们不可能制造出克隆动物。因此,细胞学实验在细胞生物学的教学中占有十分重要的位置,它不仅有助于学生对细胞学理论知识的学习和理解,同时对培养学生的细胞学研究与创新能力也至关重要。

以往的细胞学实验教学过分注重实验技术的训练,忽略了学生能力的培养。实验开设了不少,但是学生对基本的细胞学实验技术并不能真正把握,对所学的实验技术在科学研究中的用途更缺乏体会和理解。为了适应创新人才培养的需要,本书在实验内容的设置上作了大胆的尝试,从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面设置实验项目,突出综合能力和创新能力的培养。基础性实验包括细胞的观察技术、细胞化学、细胞的分离与活性检测、细胞增殖、细胞培养 5 章内容,共计 20 个实验,是细胞学的最基本、最代表本学科特点的实验方法和技术。基础性实验强调基本技术的学习和基本技能的训练,应特别注意学生的实验规范和实验习惯的养成。综合性实验主要涉及细胞融合、人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备、细胞转染、细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、小鼠胚胎干细胞的分离和培养、细胞信号转导 8 个实验,它们都是在基础性实验基础上的多技术和多层次的综合实验,实验难度较大。综合性实验强调基本技术的综合运用,应特别注意学生综合能力的培养。研究性实验是在教师的指导下,学生自己设计题目,独立开展实验,重点培养学生的创新意识 and 创新能力。因此就不为同学们提供现成的实验研究方案,否则,就无创新可言。本书提供的 7 个研究性实验题目是以编者所在单位的教学与研究为基础、考虑到细胞学基本实验技术和学生科研能力的实际而提出的几个研究课题,局限性很大,只



是想起到抛砖引玉、启发学生思维的作用,各校要根据自己的实际开拓新的价值更大的研究项目,每位学生也要展开想象的翅膀,大胆设想,广泛搜集资料,周密设计方案,独立开展研究。相信同学们一定会有所突破,有所创新,在细胞生物学实验研究中,获得创造与成功的喜悦,体验科学研究的艰辛。

由于作者水平所限,内容仍显冗杂,也可能仍存在谬误,敬请各校在使用时酌情选用,批评指正。编写过程中参阅了国内外同行的大量资料,得到了众多师长朋友的帮助,尤其是山东师范大学冯静仪教授曾经为本书中的不少基础实验的开设和改进做了大量的工作,值本书再版之际,深表谢忱。

编者

2015年3月

目 录

第三版前言

第一部分 基础性实验

| | |
|---------------------------------|--------|
| 第一章 细胞(形态与结构)的观察技术 | (2) |
| 实验 1 普通光学显微镜的结构及细胞基本形态的观察 | (2) |
| 实验 2 生物制片技术及其应用 | (7) |
| 实验 3 特殊显微镜的使用 | (14) |
| 实验 4 激光扫描共聚焦显微镜的原理与使用 | (18) |
| 实验 5 透射式电子显微镜的原理与使用 | (21) |
| 实验 6 扫描电子显微镜的原理及样品制备 | (24) |
| 第二章 细胞化学 | (26) |
| 实验 7 核酸的细胞化学 | (26) |
| 实验 8 糖类的细胞化学 | (30) |
| 实验 9 脂类的细胞化学 | (32) |
| 实验 10 蛋白质的细胞化学 | (35) |
| 实验 11 酶的细胞化学 | (38) |
| 第三章 细胞的分离与活性检测 | (43) |
| 实验 12 细胞的分离 | (43) |
| 实验 13 细胞器的分离与观察 | (45) |
| 实验 14 细胞计数与死活细胞鉴别 | (47) |
| 实验 15 细胞吞噬活性的检测 | (49) |
| 第四章 细胞增殖 | (51) |
| 实验 16 有丝分裂 | (51) |
| 实验 17 减数分裂 | (52) |
| 实验 18 动物骨髓细胞染色体标本的制备 | (54) |
| 第五章 细胞培养 | (57) |
| 实验 19 原代培养 | (57) |
| 实验 20 细胞传代培养 | (59) |



第二部分 综合性实验

- 实验 21 细胞融合 (62)
- 实验 22 人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备 (63)
- 实验 23 细胞转染——阳离子脂质体介导转染法 (66)
- 实验 24 细胞增殖——培养细胞增殖动力学检测 (67)
- 实验 25 细胞分化——植物叶片的脱分化和再分化培养 (68)
- 实验 26 细胞凋亡 (70)
- 实验 27 小鼠胚胎干细胞的分离和培养 (73)
- 实验 28 细胞信号转导——cAMP - PKA 信号通路参与酿酒酵母形态转换的研究 (77)

第三部分 研究性实验

- 实验 29 利用染色体畸变与微核试验进行安全毒理评价和环境检测 (80)
- 实验 30 生物活性物质对巨噬细胞吞噬及其酶活性的影响 (81)
- 实验 31 中药对肝脏的保护作用 (81)
- 实验 32 多糖对淋巴细胞转化的影响 (82)
- 实验 33 诱导肿瘤细胞发生凋亡的有效成分的筛选 (84)
- 实验 34 抑制肿瘤细胞增殖的有效成分的筛选 (85)
- 实验 35 STZ 诱导 I 型糖尿病小鼠胰腺组织观察 (86)

附录 (88)

实验报告例文一 (88)

实验报告例文二 (89)

实验报告例文三 (91)

参考文献 (95)

第一部分

基础性实验

第一章 细胞(形态与结构)的观察技术

细胞是生命活动的基本单位,由于细胞的体积很小,绝大多数细胞的直径小于人肉眼的最大分辨能力,因此想要看清细胞的形态结构,就必须借助于各种观察工具。光学显微镜的发明导致了细胞的发现,促使了细胞生物学的发展,至今光学显微镜仍然是细胞生物学研究中最基本和最常用的仪器。随着现代科学技术的发展,人们对于细胞世界的观察愿望在逐步提升,在普通光学显微镜的基础上,进一步发展了荧光显微镜、倒置显微镜、相差显微镜等多种有特殊功能的显微镜,使显微镜的性能更加完善,使用范围越来越广泛。由于受入射光波长的限制,光学显微镜的分辨率较低,不能观察细胞内部的细微结构。电子显微镜是以波长更短的电子束作为光源,分辨率得到了极大提高。它的发明使人们可以观察到各种细胞器的超微结构。而随着扫描隧道显微镜、激光共聚焦显微镜等一系列新型显微镜的问世,使人们对于微观世界的认识提高到了一个崭新的水平。

实验 1 普通光学显微镜的结构及 细胞基本形态的观察

【目的要求】

1. 了解普通光学显微镜的工作原理,掌握光学显微镜的使用方法。
2. 熟悉光镜下细胞的基本形态与结构。

【实验原理】

复式显微镜是由位于同一光轴的两个正透镜——物镜和目镜组成的最普通的一种显微镜,光学系统是决定其性能的主要部件。

1. 光学系统的工作原理

显微镜的光学系统由物镜、目镜、聚光器、光源等部件组成,包括两条光路:成像光路和照明光路。

(1) 显微镜的放大原理:显微镜是根据透镜成像的原理,对微小物体进行放大(图 1-1)。当被检物体 AB 放在物镜前方的 $1\sim 2$ 倍焦距之间,光线通过物镜在镜筒中形成一个倒立的放大实像 A_1B_1 ,这个实像恰好位于目镜的焦平面之内,通过目镜后形成一个放大的倒立虚像 A_2B_2 。通过调焦装置使 A_2B_2 落在人眼睛的明视距离(250 mm)处,使眼睛所看到的物体最清晰。即倒立虚像 A_2B_2 是在眼球晶状体的两倍焦距之外,通过眼球后,在视网膜形成一个正立实像 A_3B_3 ,被放大的倒立虚像 A_2B_2 与视网膜上正立实像 A_3B_3 是相吻合的。

(2) 显微镜的照明原理:显微镜的照明光路根据设计不同,有两种类型的照明方式:一种简单的照明方式称为临界照明(critical illumination),即在光源和物体之间设有一个简单的聚光器,调节这个聚光器的位置可使光源灯丝的像聚焦并且叠加在标本平面上,所

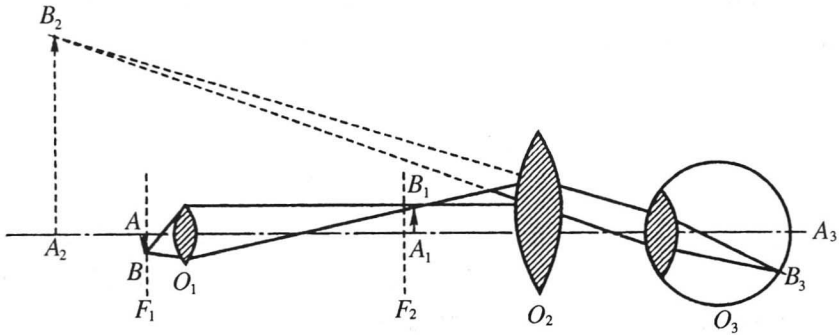


图 1-1 光学显微镜的放大原理和光路图(引自汪德耀, 1981)

O_1 物镜; O_2 目镜; O_3 眼球; F_1 物镜的前焦点; F_2 目镜的前焦点

以标本照明不均匀;另一种为科勒照明(Köhler illumination)系统,在照明光路中除有聚光器外,还在放置光源的灯室内设有集光器(图 1-2)。经过科勒照明光路后,光源灯丝的像就不再叠加在标本平面上,而是在标本平面上呈现一个照明区,这个照明区实际上是视场光阑经聚光器后在标本平面上的成像。所以,通过调节聚光器的位置,可使照明区的边界聚焦清楚;通过调节视场光阑的大小,可改变照明区的大小;通过调节聚光器上的调中螺旋,可调节照明区的位置。

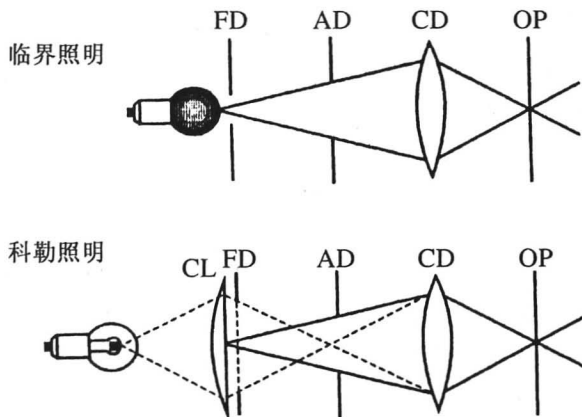


图 1-2 临界照明和科勒照明(引自林加涵等, 2000)

CL 集光器; FD 视场光阑; AD 孔径光阑; CD 聚光器; OP 载物台

科勒照明比临界照明优越之处表现在: 其一是照明均匀,因为在标本平面上成像是视场光阑而不是灯丝;其二是通过调节视场光阑的大小和位置可以控制标本平面上照明区的大小和位置。当只需要观察或测量标本的一部分时,通过缩小视场光阑,就可以减少照明区域,使标本的其他部分不受热,并且减少了杂散光的干扰。所以这种照明方式已普遍用于显微镜,成为显微观察、显微摄影、相差显微镜等必不可少的一环。

2. 光学显微镜的主要性能参数

显微镜的主要性能参数包括分辨率、放大率、清晰度、焦点深度等。

(1) 分辨率: 分辨率(resolving power)也称分辨力,是指在 25 cm 的明视距离处能区分开被检物体上两个相近质点间的最小距离。分辨率是评价各种显微镜识别微观物像能



力的重要指标。分辨率越小,说明显微镜的分辨能力越高。显微镜的分辨率和物镜的数值孔径(numerical aperture, $N.A.$, 也称镜口率)、照明光线的波长有直接关系,计算公式为:

$$R = \frac{0.61\lambda}{N.A.} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin(\alpha/2)}$$

上式中 R 为分辨率, λ 为照明光线波长, $N.A.$ 为物镜的数值孔径, n 为介质的折射率, α 为镜口角。镜口角是指位于物镜光轴上的物点发出的光线延伸到物镜前透镜有效直径的两端所形成的夹角(图 1-3)。镜口角越大,进入物镜的光线越多,理论上 $\sin(\alpha/2)$ 的最大值为 1。

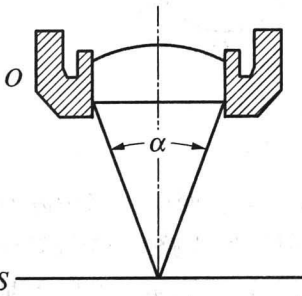


图 1-3 物镜的镜口角
O 物镜; S 标本; α 镜口角

目前在实用范围内物镜的最大数值孔径为 1.4, 而可见光最短的波长为 $0.4 \mu\text{m}$, 代入公式则:

$$R = 0.61 \times 0.4 / 1.4 = 0.17$$

由此可知,光学显微镜最大的分辨率约为 $0.2 \mu\text{m}$, 差不多等于可见光最短波长的一半。

从上式可知,要增加分辨能力(即减小分辨率)有两个办法:一是增大数值孔径,二是缩短照明光波长。由于数值孔径受介质折射率和透镜镜口角的限制,它的数值是有一定限度的,只有缩短光源的波长,才是最有效的办法。

(2) 放大率与有效放大倍数:放大率也称放大倍数。显微镜的总放大倍数等于目镜和物镜放大倍数的乘积。公式如下:

$$M = M_{ob} \times M_{oc} = \frac{\Delta}{f_1} \times \frac{250}{f_2}$$

式中: M ——总放大倍数

M_{ob} ——物镜放大倍数

M_{oc} ——目镜放大倍数

Δ ——光学筒长(单位: mm)

f_1 ——物镜焦距(单位: mm)

250——明视距离(单位: mm)

f_2 ——目镜焦距(单位: mm)

由公式可知,物镜的放大率是对一定镜筒长度而言的,镜筒长度的变化,不仅导致放大率变化,而且成像质量也受到影响,因此,显微镜的镜筒长度是一定的。标准机械筒长是从镜筒的目镜管上缘至物镜螺旋肩的距离,以 mm 表示。显微镜生产厂家将标准机械筒长标刻在物镜的外壳上,现在主要有两种标准,即 160 mm 和 170 mm。标准光学筒长是指目镜的前焦点与物镜的后焦点之间的距离。一般光学筒长略大于机械筒长。

一般情况下,放大率是所用物镜数值孔径的 500~1 000 倍,在此范围内称为有效放大倍数。如果这个乘积低于上述范围,则因放大率过低,难以观察到标本的细节;如果高于上述范围,为空放大,同样不能观察到更多的细节。

(3) 清晰度:清晰度是指显微镜形成轮廓明显物像的能力。影响物像清晰度的主要因素是物镜。由于照明光的光谱成分不同会造成色差以及透镜本身所造成的球面像差,所以像差总是难免的。同一光学系统中,放大倍数越高,像差就越大。要提高物像的清晰度,必须使用高数值孔径的物镜,并匹配低倍的目镜,而不应单纯增加目镜的放大倍数。



同时物镜对盖玻片的厚度是有一定要求的,国际上统一规定标准盖玻片的厚度为 0.17 mm,通常这一数字也标刻在物镜的外壳上。

(4) 焦点深度:当显微镜对标本的某一点或平面聚焦时,焦点平面上下物像清晰的距离或深度就是焦点深度。公式如下:

$$T = \frac{K \cdot n}{M \cdot NA}$$

式中: T ——焦点深度

K ——常数,约等于 0.24

M ——显微镜的总放大倍数

n ——被检物体周围介质的折射率

NA ——物镜的数值孔径

从上式可知,焦点深度与总放大率和镜口率成反比,因此,高放大率和高镜口率的显微镜其焦深就浅,不能看到标本的全厚度,必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。

【实验用品】

人血涂片、蚕豆根尖切片、洋葱根尖切片、兔肝切片、鼠肝切片、口腔上皮装片、马蛔虫受精卵装片、肌肉切片等。

【方法与步骤】

1. 光学显微镜的构造

光学显微镜主要由机械系统和光学系统构成。

(1) 机械系统

1) 镜筒 镜筒是安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构,其上端装有目镜,下端与物镜转换器相连(图 1-4)。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式、双筒式、三筒式、四筒式等多种,最常使用的是双筒显微镜。

2) 物镜转换器 物镜转换器又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状结构,可以按顺时针或逆时针方向旋转,其上均匀分布有

3~4 个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。转动旋转盘可使不同物镜达到工作位置(即与光路合轴),使用时注意凭手感使所需物镜准确到位。

3) 镜臂 镜臂是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时握持的部位。

4) 调焦螺旋 调焦螺旋是调节焦距的装置,分为粗调螺旋(大螺旋)和细调螺旋(小螺旋)。粗调螺旋可使载物台以较快速度或较大幅度升降,适于低倍镜观察时的调焦。细调螺旋只能使载物台缓慢或较小幅度地升降,升或降的幅度不易被肉眼观察到,适用于高倍镜和油镜的聚焦或焦距的精细调节,也常用于观察标本的不同层次,一般在粗调螺旋调焦的基础上使用。

5) 载物台 载物台也称镜台,是位于物镜转换器下方的方形平台,用于放置被观察的玻片标本。载物台的中央有圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔折射到标本上。

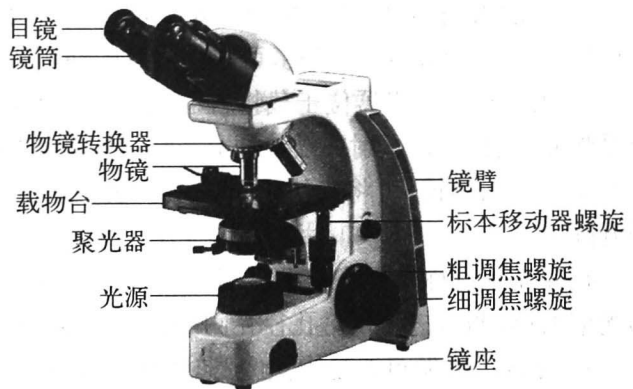


图 1-4 光学显微镜主要结构示意图



在载物台上装有标本移动器,也称推片器,其上安装的弹簧夹用于固定玻片标本,旋转推片器上的两个螺旋可使玻片标本前后左右移动,便于寻找观察目标。

6) 镜座 镜座位于最底部,是整台显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源。

(2) 光学系统

1) 物镜 物镜安装在物镜转换器上。每台光镜一般有 3~4 个不同放大倍数的物镜,每个物镜由数片凸透镜组成,是决定显微镜光学性能的主要部件。根据放大倍数可分为低倍镜、高倍镜和油镜等三种,常用的低倍镜有“4×”和“10×”,高倍镜有“40×”或“45×”,油镜为“100×”。

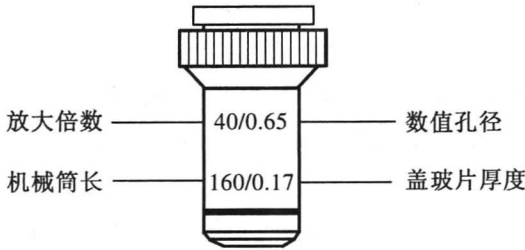


图 1-5 物镜的性能参数

物镜的金属外壳上标刻有多种数字和符号,分别代表物镜的光学性能、规格、类别和使用条件等。其中最主要的参数有放大倍数、数值孔径、机械筒长和盖玻片厚度等(图 1-5)。

2) 目镜 目镜也称接目镜,安装在镜筒的上端,其作用是将物镜所放大的中间像进一步放大,还可以校正中间像中的残余像差。每个目镜由两个透镜(即接目透镜和会聚透镜)组成,在上、下两个透镜之间设有能决定视野大小的金属制光阑,此光阑的位置就是物镜所放大实像的位置。可在光阑上安装目镜测微尺或指针,以便于观察。一般目镜的放大倍数有 5×、10×、15× 三种,可与物镜搭配使用。

3) 聚光器 聚光器位于载物台通光孔的下方,由聚光镜和孔径光阑构成,其主要功能是将光线会聚放大,射向被检样品,进入物镜。聚光镜由 2~3 个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的下方,有一调节螺旋,可调节聚光器的升降。

孔径光阑也称光圈或彩虹光阑,位于聚光器的下端,其孔径可变,能控制进入聚光镜的光束大小,调节进光量。孔径光阑的开度对显微镜的成像质量有很大影响。

4) 光源 光源可以是自然光源,也可以是电光源。利用自然光源,只需要反光镜即可。电光源常见的多为溴钨灯,灯泡的体积很小,钨丝似点状,灯壳为石英玻璃。一般为 12 V,功率 50~100 W,色光为连续光谱,色温一般在 3 200~3 400 K 之间。

2. 显微镜的使用

(1) 聚光器的调节:使用显微镜时,首先要进行光路合轴调整,将照明光束与显微镜的光轴调整到同一轴线上,使光源均匀地照明视场。

转动聚光器的升降旋钮,把聚光器升至最高位置。再打开电源灯开关,将标本放置在载物台上,用低倍镜聚焦。缩小视场光阑,在视场中可见边缘模糊的视场光阑图像,此时稍微降低聚光器,到视场光阑的图像清晰聚焦为止。旋转聚光器上的两个调中螺杆,将视场光阑图像调至视场中心;打开视场光阑,使图像周边与视场边缘相接。反复缩放视场光阑,确认光阑与视场完全重合即可。

(2) 光阑的调节:显微镜有两种光阑,即孔径光阑和视场光阑,两者都是可变光阑。孔径光阑通过光阑的缩放,限定聚光器的孔径大小;视场光阑控制照明束,限定视场大小。



正确调节光阑,能够提高物像质量。

1) 孔径光阑的调节 视场内的物像,其最大特点是反差小、焦点深度浅,但可以随着孔径光阑的缩小而提高。孔径光阑小于物镜的数值孔径时,显微镜的分辨能力和亮度降低,但物像反差和焦点深度提高,使物像更加清晰。所以,在不过多地降低分辨能力的前提下,把孔径光阑缩小到所用物镜数值孔径的70%~80%较为适宜。例如,物镜的数值孔径为1.0,孔径光阑的数值可调到0.7~0.8。

调节孔径光阑时,如果聚光器标有孔径光阑数值,转动调节环对准所需的数值即可;如果没有孔径光阑数值,可在将标本聚焦后,从镜筒中取下目镜,在物镜的后焦面可见孔径光阑的影像。

光阑缩至最小,见一亮点,逐渐开大光阑,亮孔扩大,直至需要的程度。当光阑缩小,视场亮度降低时,可适当提高电压增加照明强度。

2) 视场光阑的调节 视场光阑位于镜座中,用以控制照明光束的直径。缩小视场光阑,光束直径小于孔径光阑,视场亮度不足,物像不清晰;开大视场光阑,光束直径超出孔径光阑,因光线过多,造成光线的乱反射,也影响物像的清晰度。因此,视场光阑的适宜大小,应以光阑的内缘线外切孔径光阑或孔径光阑外边内接视场光阑为度。

(3) 油镜的使用:使用油镜时,需要用香柏油或液体石蜡作为介质。这是因为玻璃与空气的折射率不同,光线通过载玻片和空气进入物镜,部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,使视野暗淡、物像不清;在玻片标本和油镜之间填充折射率与玻璃近似的香柏油或液体石蜡,可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨能力。

不同的放大倍数、不同反差的标本需要不同的光亮度,而光亮度的调节需要将光源强度、聚光器和光阑综合协调,才会得到合适的效果,这是显微镜操作中非常重要的技术,需要长期实践,反复摸索,才能达到熟练的程度。

3. 观察标本

(1) 细胞的形态:观察人血涂片、蚕豆根尖切片、鼠肾切片、口腔上皮装片等,熟悉细胞的一般形态结构。

(2) 细胞核和核仁:观察肌肉切片、鼠肝切片,注意细胞的多核及多核仁现象。

(3) 中心体:观察马蛔虫受精卵装片,注意中心体的分布及形态特点。

(4) 叶绿体:观察菠菜叶片临时装片,注意观察类囊体的形态与数目特点。

(5) 高尔基复合体:观察猫的神经细胞装片,注意高尔基体的形态特点及分布。

【实验报告】

1. 简述显微镜的主要结构和操作要领。
2. 分析在使用低倍镜、高倍镜和油镜时,对光亮度的要求。
3. 分析聚光镜在成像质量中的作用。
4. 绘图比较所观察到的不同的细胞形态与结构,对其形态结构与功能的关系进行分析。

实验2 生物制片技术及其应用

在利用显微镜对生物样本进行观察的过程中,由于多数生物组织是由多层细胞构成的,光线无法完全透过,因此不能直接利用显微镜进行观察。要想在显微镜下对其结构进



行观察,首先必须将其分离成单个细胞或薄片,固定于一定的载体(如玻片上),经染色等处理,使其更易观察,对生物材料的这一处理过程称为生物制片。生物制片的方法,可分为切片法和非切片法两大类。

生物组织往往比较柔软,不易被切成薄片。切片法是用某种介质包埋生物组织,使组织保持一定的硬度,再用切片器将组织切成薄片,经染色等处理制成玻片标本。根据所用包埋介质的不同,可分为石蜡切片法、冰冻切片法和超薄切片法等,石蜡切片和冰冻切片用于光学显微镜观察,超薄切片用于电镜观察。

非切片法是不经过切片,用物理或化学方法将生物组织分离成单个细胞或薄片,或将生物体整体封藏进行制片的一种方法,常用的非切片法有涂片法、压片法、滴片法和印片法等。非切片法简单易行,快速方便。涂片法就是将组织或细胞均匀地涂在载玻片上,以染色后观察,动物血液、骨髓、精液等以及植物花粉母细胞等样品可用涂片法制片。压片法是将一些柔软的材料(如动物果蝇或摇蚊幼虫的唾液腺、植物的根尖等)在载玻片上压碎的一种非切片法,观察有丝分裂过程或制备染色体标本,可采用此法制片。滴片法是将组织或细胞解离成细胞悬液,直接滴到载玻片上。骨髓细胞、体外培养细胞、肝组织、脾脏、生殖腺、早期胚胎等,均可制成细胞悬液,用滴片法制片。制备动物染色体标本时常采用滴片法。印片法是将新鲜组织的表面或切片向载玻片上印一下,细胞即被沾在载玻片上,经染色后即可观察。

根据保存时间的长短,生物制片又可以分为临时制片和永久制片。临时制片适合于临时性的观察,生物材料往往不需要进行固定、脱水与封固处理,但制片不能长时间保存。永久制片可以长期保存,便于以后对其进行研究和教学,制片过程中必须要对生物材料进行固定、脱水与封固处理。

2-1 血涂片的制备和细胞大小的测量

【目的要求】

1. 掌握血涂片的制备方法。
2. 认识红细胞及各种白细胞的典型形态。
3. 掌握显微测微尺的使用方法。

【实验原理】

血涂片是临床化验中最常规的技术,也是血液学研究中的最基本技术。将血液样品制成单层细胞的涂片标本,经瑞氏(Wright)染液染色后,不同白细胞中的颗粒可以呈现不同的颜色。碱性粒细胞的颗粒呈蓝紫色,酸性粒细胞的颗粒呈橘红色,中性粒细胞的颗粒呈粉红色。根据细胞中颗粒的颜色、大小及多少,再结合细胞的大小及细胞核的形态,就可以将白细胞进行分类计数。

【实验用品】

1. 器材:医用一次性采血针、酒精棉球、镊子、经脱脂洗净的载玻片、目镜测微尺和镜台测微尺。

2. 试剂:瑞氏(Wright)染液

瑞氏粉 0.1 g

甲醇 60 mL



瑞氏粉 0.1 g 置洁净研钵中,加入 10~20 mL 甲醇,充分研磨,将已溶部分移入试剂瓶中,未溶部分加适量甲醇研磨,直至全部溶解。24 h 后即可使用,保存时间越久,染色能力越强。

【方法与步骤】

1. 血涂片的制备与血细胞的观察

(1) 采血:采血前用 70% 酒精棉球消毒人的指腹或耳垂,干后用采血针刺破指腹或耳垂的皮肤;动物采血时先将耳部剪毛,酒精消毒后,刺破动物耳部皮肤,弃去第一滴血(因含单核白细胞较多)。

(2) 涂片:挤出第二滴血置于载玻片的一端,再取另一张边缘光滑的载玻片,斜置于血滴的前缘,先向后拉动推片,使其轻轻触及血滴,使血液沿玻片端展开成线状,两玻片的角度以 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 为宜(角度过大血膜较厚,角度小则血膜薄),轻轻将载玻片向前推进,即涂成血液薄膜(图 2-1)。推进时速度要一致,否则血膜成波浪形,厚薄不匀。

(3) 染色:待涂片在空气中完全干燥后,滴加数滴瑞氏染液盖满血膜为止,染色 1~3 min。然后滴加等量的蒸馏水,使其与染液均匀混合,静置 5~10 min。用蒸馏水冲去染液,吸水纸吸干,镜检。

(4) 封片:经染色的涂片完全干燥后,用中性树脂胶封片保存。

(5) 观察:分别用低倍镜、高倍镜和油镜观察血涂片,分辨不同的细胞类型。外周血液中白细胞主要有 5 种类型,即单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。单核细胞是血液中具有吞噬能力的一类细胞,它与组织巨噬细胞同源。其形态特征为细胞核呈马蹄形或肾形,细胞直径为 $14\sim 20\ \mu\text{m}$,核质比较大。淋巴细胞是与机体免疫功能密切相关的细胞类型,分为 T、B 淋巴细胞两种类型,但是利用瑞氏染色并不能对这两种淋巴细胞进行区分。淋巴细胞的典型形态学特征是细胞核质比大,细胞核多为圆形。而血液中粒细胞则可以根据胞质颗粒的嗜色性进一步区分为中性、嗜酸性和嗜碱性三种类型。嗜碱性粒细胞的颗粒呈蓝紫色且颗粒较大,嗜酸性粒细胞的颗粒呈现橘红色,中性粒细胞的颗粒呈粉红色且颗粒较小。但所有的粒细胞的细胞核具有共同的形态特征,细胞为分叶核或腊肠状核。一般来说核分叶越多,细胞的衰老程度越严重。观察时可根据细胞的形态特征判定其细胞类型。

2. 显微测微尺的使用

显微测微尺是用来测量在显微镜下所观察到的物体的长度、面积的工具,包括镜台测微尺、目镜测微尺两部分。镜台测微尺是一块中央固定了一圆形测微尺的特殊载玻片,该测微尺长 1 mm 或 2 mm,分成 100 或 200 格,每格的实际长度为 $0.01\ \text{mm}(10\ \mu\text{m})$,是专门用来标定目镜测微尺上每一刻度所代表的微米数的。

目镜测微尺是放在目镜中的一种标尺,分为固定式和移动式两种。固定式目镜测微尺是一块圆形玻片,中心刻有标尺,有直线式的,有网式的,标尺一般长 5~10 mm,分成

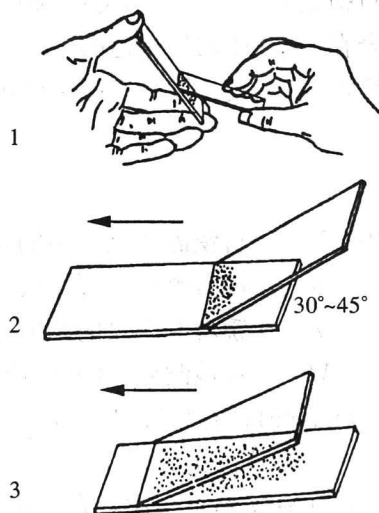


图 2-1 血涂片的制备方法