

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学 与遗传学实验指导

第3版

主编 杨建一



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学 与遗传学实验指导

第3版

主 编 杨建一
副主编 李 莉 张明亮
编 者 (按姓氏笔画排序)

马红莲	师如意	刘 铭
杜圣家	杨建一	杨康鹃
李 兰	李 莉	宋国华
张明亮	张 娟	岳凤珍
赵俊霞	聂晨霞	殷丽天
崔小华	慕明涛	

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

本教材是全国高等院校医药实验教学规划教材,汇集国内八所高等院校的教授专家编写而成,可与《医学细胞生物学》《医学遗传学》和《医学生物学》等理论教材同步配套使用。全书由两大部分共13个实验组成,就每个实验项目的实验目的、实验用品、实验原理、实验技术与步骤、结果观察,以及注意事项等有详尽的介绍与论述。本书附有可选择的作业和思考题,有70余幅插图和46幅彩色图片,图像清晰生动,能帮助学生更加直观地认识和理解实验的内容,弥补可能实验条件所限导致的不足。附录中包括实验所用试剂、溶液等的配制方法,动物实验基本知识,细胞培养基本技术,还有实验中的英汉医学细胞生物学与遗传学实验技术专业主要词汇等。教材中的所有内容非常便于理解和操作,并且还有助于培养和启发学生的思维扩展能力,提高实验教学质量。

本书主要针对五年制学生实验使用,部分内容也可用于七、八年制和四年制学生。由于囊括细胞生物学、医学遗传学和医学生物学实验教学内容,不仅是高等医药院校这三门课程的实验课配套教材,同时也适用于综合性大学相关课程的实验教学。教师们在使用该教材时可根据实际情况做内容和学时上的选择和调整。本教材也可作为从事医药卫生学科和生物学领域各层次的教师、临床医护人员,科研人员的学习参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学与遗传学实验指导 / 杨建一主编. —3版. —北京:科学出版社,2015.6

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-044599-5

I. ①医… II. ①杨… III. ①医学-细胞生物学-实验 ②医学遗传学-实验
IV. ①R329.2-33 ②R394-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第126189号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:朱光兰

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

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>

安泰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年6月第 三 版 印张:8 1/2 插页:4

2015年6月第十一次印刷 字数:198 000

定价:32.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第3版前言

《医学细胞生物学与遗传学实验指导》第3版是继该书2010年第2版以来,经历了5年之后,现在又一次重新编写。本实验指导自出版发行以来,一直得到了广大用书师生的好评和鉴赏,岁月荏苒,我们真诚感谢他们的厚爱。

在这次的再编写中,我们汇集了国内八所院校教学第一线的专家教授,积极采纳各校老师与学生们的意见与建议,充分酝酿,力求基本适合国内各高等医药院校本科学生实际教学的要求,提高实验教学质量。

本实验指导分为医学细胞生物学实验和医学遗传学实验两大部分。每一部分按实验内容进行了分类,共计13个实验,本版增加了细胞凋亡检测技术、流式细胞仪检测细胞周期和人类高分辨显带染色体标本的制备等实验项目。各实验中对每个实验项目的实验原理、技术方法及注意事项等都有充分的论述,并有可选择的作业和思考题,有助于培养和扩展学生的独立思考能力。附录中列入了实验所用各种溶液的配制、细胞培养基基本知识、实验动物基本操作技术以及英汉医学细胞生物学与遗传学实验技术专业英语词汇。我们对附图中的彩色图片重新拍照编排,使得图像更加清晰实用,力图帮助学生更加直观地认识和理解实验的内容,同时也会弥补可能实验条件所限导致的不足。

本书不仅适用于高等医药院校本科生的细胞生物学、医学遗传学以及医学生物学的实验课教学,同时也适用于综合性大学相关课程的实验教学,也可作为从事本领域教学和科研人员的参考用书。

在编写过程中,本书参阅了国内外同行的相关实验指导和教材的内容,在此谨向这些书的主编和编者表示诚挚谢意。

感谢科学出版社在本书的再次出版中给予的关心和指导。感谢我们的各位编委具有的强烈责任心、认真的态度和付出的辛劳。

由于我们的水平和经验有限,不妥之处难免,企盼尊敬的师生、众多的同行和热心的读者们在使用或阅读本书后,继续指正和谏言。

杨建一

2015年4月

第1版前言

细胞生物学和医学遗传学均是生命科学的重要基础学科,近二十年来,这两个学科发展迅速,其研究成果已广泛应用于基础医学和临床医学,是现代医学教育中的重要课程,掌握这两门学科的实验研究方法对于从事基础医学和临床医学工作是十分必要的。

医学细胞生物学与遗传学实验既与课堂讲授的理论部分有关,同时又有本身特殊的目的与任务。第一,实验是科学理论的实践,通过实验可以巩固和加深对这两门课程知识和理论的理解,同时又可获得感性认识。第二,通过实验,使学生接受基本实验技能的训练,如显微镜的使用,临时显微标本片的制备,生物作图等。第三,通过实验,培养学生实事求是的科学态度和独立自学的工作能力,从而可以掌握观察问题和分析解决问题的方法,为医学的后续课程打下坚实的基础。

基于目前国内大部分院校已分别开设细胞生物学和医学遗传学两门课程,本实验指导主要针对五年制本科生这两门课的实验教学而编写。其中部分实验适用于七年制学生和研究生教学。实验内容既能适应医学生物学实验教学的需要,也能满足细胞生物学和医学遗传学分设的实验教学要求,即具有广泛的适用性。由于各院校的这两门课程实验学时多少有差异,在使用过程中可根据本校的实际情况作适当选择和调整。

实验指导由两部分组成,前一部分为医学细胞生物学实验,后一部分为医学遗传学实验。且尽量与实际实验学时数相符。需要说明的是,每一节的内容安排是基于内容的相关性,并不完全代表是一次实验课的内容。

本实验指导共编入实验24个,对每个实验项目的实验原理,技术方法及注意事项等有充分的阐述,并有可选择的作业,思考题,有助于培养学生的独立思考能力。附录中列入了实验所用溶液的配制、动物基本操作、细胞培养基本知识以及专业英语词汇,并特别收录了一些相关专业网站,以弥补实验课时的不足,开阔同学们的视野,提高独立学习的积极性。

各位编者本着对学生负责的态度,认真、细致地编写每一个实验内容,付出了辛勤的劳动。我们期待着同学们在按照这本实验指导完成实验后的可喜收获,也希望使用过这本书的老师们和同学们提出宝贵的修改意见,同时也准备在教学实践中不断补充和完善指导的内容,以适应教学改革的需要。

本书在编写过程中参考了有关实验指导和教材的内容,在此谨向这些书的主编和作者们表示深深的谢意。科学出版社的同志们为本书的顺利出版作了积极的努力与大量的工作,在此表示由衷的谢意。

杨建一

2005年3月

目 录

第3版前言

第1版前言

实验室规则	(1)
一、实验程序与要求	(1)
二、实验规则与注意事项	(1)
第一部分 医学细胞生物学实验	(3)
实验一 光学显微镜技术	(3)
一、普通光学显微镜的构造和使用方法	(3)
二、细胞显微测量技术	(7)
三、细胞计数和活力鉴定	(10)
实验二 动植物细胞的基本形态与结构	(12)
实验三 细胞内细胞器和细胞结构的观察	(15)
一、细胞内细胞器的显示	(15)
二、细胞骨架系统的显示与观察	(18)
实验四 细胞内几种主要生物大分子的原位显示	(20)
一、细胞内核酸的原位显示	(20)
二、细胞内蛋白质的原位显示	(22)
三、细胞内脂类的原位显示	(23)
四、细胞内糖类的原位显示	(24)
实验五 细胞的分裂活动	(25)
一、动植物细胞的无丝分裂与有丝分裂活动标本观察	(25)
二、动物细胞的减数分裂活动标本观察	(29)
实验六 细胞的生理活动观察	(32)
实验七 细胞培养和检测技术	(34)
一、细胞融合实验技术	(34)
二、染色体超前凝聚的诱导和观察	(36)
三、细胞凋亡检测技术	(39)
四、流式细胞术检测细胞周期	(47)
第二部分 医学遗传学实验	(50)
实验一 人类性染色体的标本制作与观察	(50)
实验二 人类和动物的染色体制作技术与分析	(53)
一、人类外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备	(53)
二、小鼠骨髓细胞染色体标本制备	(56)
三、人和动物的非显带染色体镜下观察	(58)
四、人类染色体G显带技术及G显带核型分析	(61)
五、人类高分辨显带染色体标本的制备	(66)
六、人羊水细胞培养及染色体标本的制备观察	(68)
七、姐妹染色单体交换(SCE)标本制备与分析	(71)

实验三 人类一些正常性状的遗传分析	(73)
一、苯硫脲尝味实验	(73)
二、ABO 血型检测	(74)
三、MN 血型检测	(77)
四、人类皮肤纹理分析	(78)
实验四 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核测定	(86)
实验五 动物细胞基因组 DNA 的提取	(88)
实验六 遗传病系谱分析与讨论	(89)
参考文献	(93)
附录	(94)
附录一 试剂浓度的表示方法及其计算	(94)
附录二 实验常用溶液的配制	(95)
附录三 细胞培养基本知识	(100)
附录四 动物实验基本技术	(114)
附录五 英汉医学细胞生物学与遗传学技术词汇	(127)
附图	

实验室规则

一、实验程序与要求

1. 课前预习 要求学生在课前认真预习实验指导及教材中的有关章节,在进入实验室前,必须对该实验的目的要求、实验内容、基本原理和操作方法有一定的了解。

2. 按时入座 上实验课时必须携带实验指导和完成实验报告的文具,穿好白衣进入实验室,按指定座位入座。

3. 观看录像 每个实验之前,一般是先看录像,以便对实验内容概括了解。

4. 教师讲解 教师对实验内容的安排及注意事项等进行短时间的讲解。

5. 独立操作和观察 实验一般是独立操作,个别实验以 2~3 人为小组进行。在实验中要按实验指导认真操作,仔细观察,做好记录。有关基本技能的训练,严格按照规定的操作程序进行,反复练习,切实掌握,以能达到一定的熟练程度。要求学生观察和操作时认真细心,自觉养成一丝不苟的科学作风,力求做到严肃、严格、严密。

6. 教师示教 有些实验除学生独立操作的项目外,尚有教师示教。示教的目的和作用有两点:一是在对较难观察的但属基本要求掌握的内容,学生可先看示教,获得初步认识后再独立操作与观察;二是在保证实验内容的同时,扩大在实验课有限时间内获得更多感性认识的机会。

7. 作业与实验报告 实验结束后,根据自己的观察、记录和结果,实事求是地撰写实验报告或认真完成作业,不得抄袭教材或其他同学的报告。实验报告或作业应在实验室完成,于本实验结束后上交老师。实验报告的形式可因实验内容而不同,基本包括文字报告、公式计算、绘图和列表等。每次报告经老师批阅后,记录下成绩,下次实验时发给

二、实验规则与注意事项

(1) 每位学生必须严格遵守实验室规则,上实验课时不得迟到、早退或无故缺席,有病或有事需请假时,须向任课老师报告声明。

(2) 实验前须携带实验指导、实验报告纸、绘图工具(2H 或 3H 铅笔、橡皮、直尺或三角板)。

(3) 使用光学显微镜观察实验,必须携带显微镜借用卡片,提前向显微镜室借取显微镜。

(4) 实验前,必须认真检查所用仪器、药品、试剂、标本片等是否完好、齐备,如有缺损向老师报告,自己不得随意调换标本、仪器等。

(5) 培养良好的社会公德,爱护国家财产,严格遵守操作规程,爱惜仪器设备和标本材料,节约药品和水电。如有损坏标本、仪器等应立即报告,主动登记,说明情况,按规定酌情赔偿。

(6) 进入实验室后要安静、整洁。不得大声嬉笑或随意走动,有问题时举手提问;不得在室内吸烟、吐痰、吃零食、乱扔纸屑和其他杂物;不得将与实验无关的物品带入实验室;不得将实验室物品带出实验室;不准在实验台和仪器上乱涂乱画,维护室内的公共卫生。

(7) 在实验过程中,仪器设备发生故障或损坏时,应切断电源,并立即报告任课老师,及时处理。

(8) 实验中使用易燃、易爆、有毒试剂或传染性强的物质时,应严格操作,注意自我保护,如发生意外,应立即报告任课老师。

(9) 实验结束后,将仪器设备物归原处,实验用具洗净晾干,标本放归原处。动物尸体及实验用的废物按要求放于指定地点,清理所用过的实验台面。值日生负责清扫室内卫生,关好水、电开关和窗户,保证安全。经任课老师检查认可后,方可离开实验室。

第一部分 医学细胞生物学实验

实验一 光学显微镜技术

一、普通光学显微镜的构造和使用方法

【实验目的】

- (1) 熟悉光学显微镜各部分的构造、用途及维护方法。
- (2) 初步掌握显微镜的低倍镜、高倍镜和油浸镜的使用方法。

【实验原理】

光学显微镜(light microscope),简称光镜,是利用光学原理,把微小物体放大成像,以供人们获取微细结构信息的光学仪器,是医学实验常用的仪器之一(图 1-1-1)。

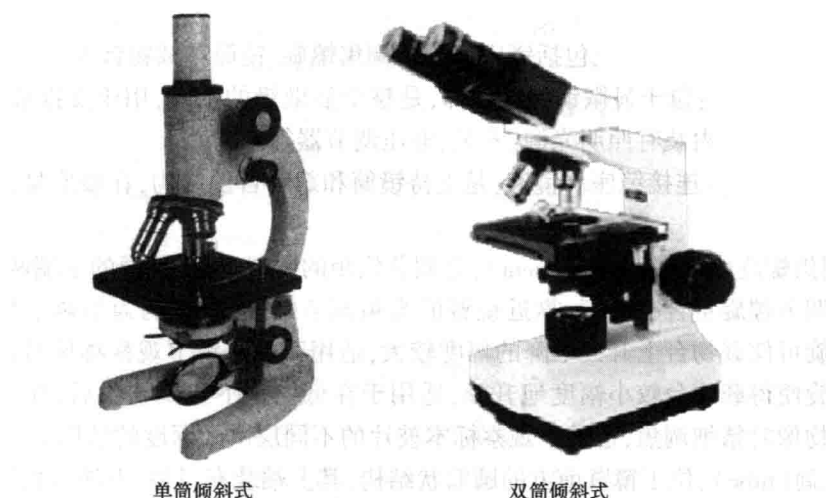


图 1-1-1 两种普通光学显微镜

光学显微镜的成像原理是:显微镜物镜的焦距(focus)很短,被观察标本处在物镜一倍焦距和二倍焦距之间,此时在镜筒中成放大的实像。同时,目镜的焦距较长,这个实像便落在目镜的一倍焦距之内,经过目镜的再次放大,镜筒外靠近眼睛的地方便形成了经过放大的物体的虚像(virtual image),在人眼的明视距离(约 250mm)处形成一个虚像,所以,人眼通过显微镜所观察到的像实际上是被放大的虚像。

【实验仪器、材料与试剂】

1. 器材 光学显微镜、擦镜纸、白细布。
2. 标本 羽毛装片、蛙血涂片。
3. 试剂 香柏油、镜头清洗液。

【实验内容与步骤】

1. 光学显微镜的构造 光镜分为机械装置和光学系统两部分(图 1-1-2),目前常用的是双筒显微镜,以下用双筒显微镜加以说明。

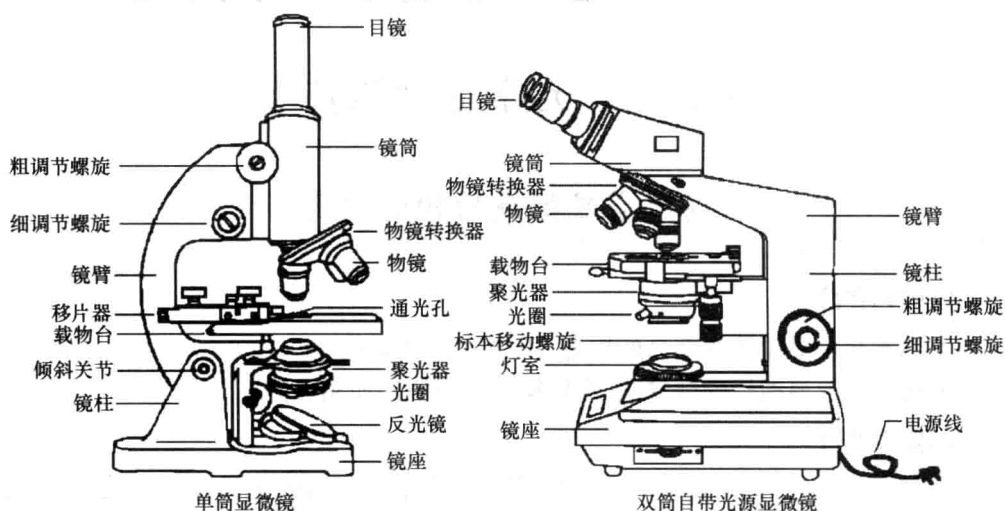


图 1-1-2 普通光学显微镜结构示意图

(1) 机械装置:机械装置包括镜座、镜臂、调焦螺旋、镜筒和载物台等。

1) 镜座 (base):位于显微镜的最底部,是整个显微镜的基座,用于支撑和稳定镜体。双筒显微镜在镜座内装有照明光源、开关、电压调节器等结构。

2) 镜臂 (arm):连接镜座和镜筒,是支持镜筒和载物台的结构,在搬取显微镜时用手握持镜臂。

3) 调焦螺旋 (focusing adjustment):是调节焦距的装置,位于镜臂的下端两侧,粗调节螺旋和细调节螺旋重合在一起,靠近镜臂的为粗调节螺旋,外侧的为细调节螺旋。转动粗调节螺旋可使载物台上升或下降的幅度较大,适用于低倍镜下观察物像时调焦。转动细调节螺旋使得载物台较小幅度地升降,适用于在低倍镜下找到物像后,在高倍镜和油镜下观察物像时精细调焦,也用于观察标本玻片的不同层次及深度的结构。

4) 镜筒 (tube):位于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。双筒式显微镜,均为倾斜式,其目镜与物镜的中心线互成 45° 。在镜筒中装有使光线转折 45° 的棱镜 (prism)。

5) 物镜转换器 (revolving nose-piece):是安装在镜筒下方的一个可旋转的圆盘状结构,其上装有 3~4 个不同放大倍数的物镜。转动物镜转换器可使不同的物镜到达工作位置,当物镜进入光路时,可以听到微弱的“咔嚓”一声,这时就可以开始观察标本了。

6) 载物台 (stage):是位于物镜转换器下方的平台,用于放置玻片标本。载物台的中央有通光孔,来自下方的光线可通过通光孔到达玻片标本上。载物台上装有标本移动器,弧形的弹簧夹用于固定标本玻片。载物台左下方有标本移动器螺旋,转动上下两个螺旋可使玻片标本前后左右移动,以便找到要观察的物像。

在标本移动器上附有纵、横游标尺 (vernier),用以确定标本在视野中的方位及其大小。游标尺由主标尺 (A) 和副标尺 (B) 组成,副标尺的分度为主标尺的 $9/10$ 。使用时,首

先看副标尺的0点位置,再看主、副标尺的一致点,副标尺的0点在主标尺的26与27之间,副标尺的4与主标尺的30重合,那么该标尺所表示的数值应为26.4(图1-1-3)。

(2) 光学装置:光学装置包括目镜、物镜、聚光器、可变光阑和滤光片。

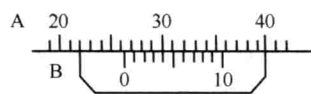


图 1-1-3 游标尺的用法

1) 目镜(ocular):安装在镜筒的上端,其上标有放大倍数,如“10×”、“15×”(×表示放大倍数),最常使用的是“10×”目镜。目镜中常装有一小段金属丝作为指示针,用以指示视野中所要观察的物像。

2) 物镜(objective):安装在物镜转换器上,分为低倍镜、高倍镜和油镜(又称为油浸镜)三种。物镜的主要参数包括:放大倍数、数值孔径和工作距离。放大倍数是指眼睛看到像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。例如,放大倍数为40×,指的是长度是1μm的标本,放大后像的长度是40μm。常用物镜的放大倍数有“4×”、“10×”、“40×”和“100×”等几种。“4×”、“10×”物镜为低倍镜,“40×”物镜为高倍镜,“100×”物镜为油镜,油镜镜头上标有“油(或oil)”字样。数值孔径也叫镜口率(numerical aperture, NA),是物镜和聚光器的主要参数,与显微镜的分辨力成正比。干燥物镜的数值孔径为0.05~0.95,油浸物镜(香柏油)的数值孔径为1.25。在使用油镜时,需要用香柏油作为介质(medium),这是因为香柏油与玻璃的折射率(refractive index)相近,在玻片标本和油镜之间滴加香柏油,可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨能力。工作距离是指当所观察的标本表现出最清楚时,物镜的最下端到标本盖玻片上表面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关,物镜的焦距越长,放大倍数越低,其工作距离越长。例如,10倍物镜上标有10/0.25和160/0.17,其中10为物镜的放大倍数;0.25为数值孔径;160表示使用该物镜时,显微镜的机械筒长应为160mm(所谓机械筒长是指取下物镜和目镜以后,所剩下的镜筒长度。显微镜的机械筒长现已统一规定为160mm);0.17为盖玻片的标准厚度(单位:mm)。10倍物镜有效工作距离约为6.5mm,40倍物镜有效工作距离约为0.48mm,40倍物镜有效工作距离约为0.48mm(图1-1-4)。

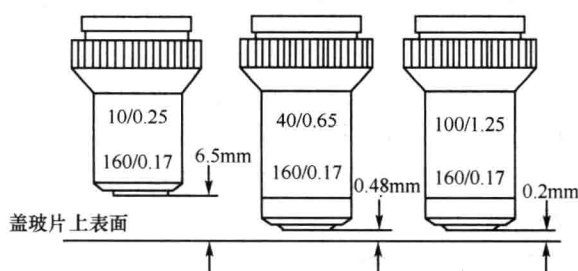


图 1-1-4 三种物镜的性能参数及工作距离

显微镜的放大倍数等于目镜的放大倍数乘以物镜的放大倍数,例如,目镜的放大倍数是10×,物镜的放大倍数是40×,则显微镜对实物的放大倍数为400倍。常用光镜的最大放大倍数为1000倍。

3) 聚光器(condenser):位于载物台的下方,是一组透镜(lens),可将光线汇聚到所要观察的标本上,增加视野的亮度。在聚光器的右侧,有一调节螺旋,转动它可使聚光器上升或下降,从而调节光线的强弱。上升聚光器可使光线增强,下降则光线变暗。

4) 可变光阑(diaphragm):位于聚光器的下端,能够控制进入聚光器光束(beam of

light)的大小。由十几张金属薄片组合排列而成,其外侧有一小柄,拨动它可使金属片分开或合拢,以调节光线的强弱。

5) 滤光片(light filter):有些显微镜配有不同波长的滤光片供选用。显微镜所用的滤光片通常为几个毫米厚的有色玻璃片。滤光片可以滤出与其本身颜色相同颜色的光。使用不同的滤光片,可以有选择地使用不同颜色的照明光线,使观察效果更佳。滤光片常被放置在聚光镜最下方的圆环(cirque)内,拨动圆环使其移出光路,可根据需要选择使用。

2. 光学显微镜的使用方法

(1) 低倍镜(low power lens)的使用方法

1) 对光:打开镜座前方的电源开关,调节物镜转换器,使低倍镜头对准通光孔,当听到“咔嚓”的一声,同时手也感到有阻力时,说明物镜处于正确的位置。打开光阑并使聚光器上升到比载物台稍低的位置。调节目镜,使两个目镜的距离恰好等于自己双眼的瞳孔的距离,然后两眼观察目镜,同时调节镜座右侧电压调节开关,使视野内的光线亮度适中。

2) 放置玻片标本:将所要观察的玻片标本放置在载物台上,用弹簧夹固定,要让有盖玻片的一面朝上。转动标本移动器旋钮,使需要观察的标本位于通光孔的中央。

3) 调节焦距:眼睛从侧面观察低倍镜,同时转动粗调节螺旋使载物台上升,直至低倍镜头距玻片标本约0.5cm(或者上升至转动为止);然后两眼在目镜上观察,同时慢慢转动粗调节螺旋使载物台下降,视野中出现物像后,用标本移动器移动标本片使物像移至视野中央。这时要注意,移动玻片的方向与目镜中观察的物像移动方向是相反的。再转动细调节螺旋,直至视野中的物像变得最清晰。

用羽毛片(附图1,附图2)和蛙血涂片反复练习低倍镜的使用,做到熟悉显微镜各部分的结构,迅速熟练地调节光线及找到标本。

(2) 高倍镜(high power lens)的使用方法

1) 首先在低倍镜下找到需观察的物像,把要放大的部分移至视野中央,同时转动调节螺旋使物像清晰。

2) 转动物镜转换器,使高倍镜镜头对准通光孔。这时要从侧面观察,如果高倍镜碰到玻片,遇到阻力时,说明低倍镜的焦距没有调节好或者标本放反了,要重新进行操作。

3) 调节焦距:将高倍镜镜头对准通光孔后,视野中的物像往往不太清晰,可轻轻调节细调节螺旋便可使物像清晰。

从低倍镜到高倍镜反复练习观察羽毛片和蛙血涂片(附图3),注意观察不同类型的蛙血细胞、红细胞形态特征及细胞三部结构中各部分的比例。

(3) 油镜(oil immersion lens)的使用方法

1) 在低倍镜或高倍镜下找到所需观察的物像后,将需要进一步放大的部位移至视野的最中央。将视野中的光线调到最强,即聚光器上升至较高位置并将光阑全部打开,同时将镜座右侧的电压开关调到最大。

2) 转动物镜转换器,移开低倍镜或高倍镜头,在标本玻片上所要观察的部位加1滴香柏油,转换物镜转换器,使油镜镜头对准通光孔,这时油镜的下端正好浸在香柏油中。

3) 双目观察目镜,并轻轻转动细调节螺旋,直至视野中出现最清晰的物像。

4) 油镜使用结束后,一定及时用滴加上镜头清洗液(二甲苯、乙醇、乙醚等)的擦镜

纸擦拭干净油镜和高倍镜镜头。再用清洁的擦镜纸盖在标本玻片上,加1~2滴清洗液,轻拉擦镜纸,将标本片擦拭干净。

按照上述操作程序,用蛙血涂片练习油镜的使用。

【结果观察】

取羽毛装片及蛙血涂片,按照操作规则反复练习低倍镜、高倍镜和油镜的使用。

【注意事项】

(1) 搬取显微镜时,要一手握镜臂,另一手托住镜座,两上臂紧靠胸壁;切勿一手斜提,前后摆动,以防目镜镜头或其他零部件跌落。

(2) 轻拿轻放,不要把显微镜放置在实验台的边缘,显微镜镜座后缘离实验台边缘应保持一定距离,以免显微镜翻倒落地。

(3) 显微镜光学系统要用清洁的擦镜纸擦拭,不能用手、纱布或其他物品擦拭,以免造成划痕。

(4) 不要随意取出目镜和拆卸显微镜上的零部件,以防尘土落入镜筒及零部件丢失,或影响显微镜的精准度。

(5) 使用显微镜时要注意将玻片标本放置在通光孔中央,不要放反。如果放反了,低倍镜下可以看清楚物像,转动到高倍镜时就看不清物像,并且容易将玻片标本损坏。在使用高倍镜和油镜时,不能一边在目镜中观察,一边上升载物台,否则会压碎玻片或损坏镜头。

(6) 观察标本时,做到双目同睁,两手并用。低倍镜下可以用粗、细调节螺旋调节焦距,调节焦距时,要从侧面注视载物台上升,以免压坏标本和镜头。当转换高倍镜和油镜观察时,要用细调节螺旋调节焦距,且细调节螺旋不能单方向过度旋转。

(7) 显微镜使用完毕后,将标本玻片取下,放回标本盒中;转动物镜转换器,使物镜离开通光孔,上升载物台,使物镜与载物台相接近。然后一手握镜臂,另一手托住镜座,将显微镜送还显微镜室。

【思考问题】

(1) 使用显微镜观察标本片时,应遵循哪些步骤才能看到最清晰的物像?

(2) 当低倍镜下看清楚物像了,进一步转换高倍镜后物像看不见或调不清晰时,这是为什么?你应从哪些方面找原因?

(3) 如果显微镜视野中光线太暗,你应该怎么办?

(李 莉)

二、细胞显微测量技术

【实验目的】

掌握显微测微尺的基本原理及使用方法。

【实验原理】

细胞长度、面积、体积的测量是研究正常或病理组织细胞的基本方法之一。在显微镜下用来测量细胞长度的工具叫显微测微尺(micrometer),由目镜测微尺(ocular microm-

eter)和镜台测微尺(stage micrometer)两者组成,两尺须配合使用。

目镜测微尺,简称目微尺,是一块圆形的玻璃片,直径为20~21mm。其上刻有直线或网格式的标尺。其中网格式的目微尺可用来测量物体的体积。每一小格表示的实际长度随不同的显微镜、不同放大倍数的物镜而不同。使用目微尺时,先将目镜从镜筒中抽出,旋去接目透镜,然后将目微尺放在目镜光阑上。注意让有刻度的一面朝下,再将接目透镜旋上,把目镜插入镜筒,即可进行测量。

镜台测微尺,简称台微尺,是一块特制的载玻片。它的中央封着一把刻度标尺,标尺全长为1mm(1000 μ m),分为10个大格,每一个大格又分成10个小格,共100个小格,每小格的长度为0.01mm(10 μ m)。标尺的外围有一小黑环,便于找到标尺的位置。

显微测量时,先用台微尺标定目微尺每小格所表示的实际长度。

通过台微尺对目微尺进行标定,可以消除由于显微镜不同所造成的误差。

在测量细胞时,移去台微尺,换上被测标本,用目微尺即可测得观察标本的实际长度(图1-1-5)。

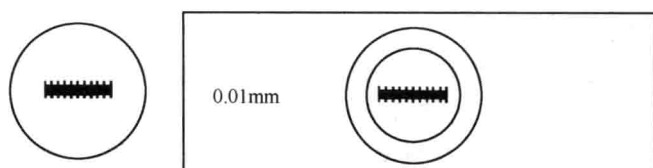


图 1-1-5 目镜测微尺和镜台测微尺结构示意图

【实验仪器、材料与试剂】

1. 材料 人或蟾蜍血涂片、人口腔黏膜上皮细胞制片。

2. 器材 显微镜、目镜测微尺、镜台测微尺、解剖剪、解剖镊子、载玻片、盖玻片、试管、无菌采血针、牙签。

3. 试剂 生理盐水、瑞氏(Wright)染色液、0.2%甲苯胺蓝染液。

【实验内容与步骤】

1. 血细胞标本制备及观察

(1) 人血涂片:用采血针刺取耳垂血,制成薄血涂片,晾干后瑞氏染色。

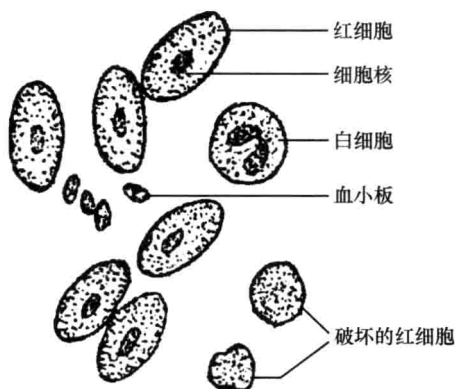


图 1-1-6 蟾蜍血中的各类细胞

(2) 蟾蜍血涂片:用注射器直接取蟾蜍心脏血,用生理盐水稀释后制成细胞悬液,制成涂片。蟾蜍的红细胞呈椭圆形,细胞膜不明显,涂片中除红细胞外,还能看到各种形态不同的白细胞和血小板(图1-1-6)。

2. 人口腔黏膜上皮细胞标本制备及观察

取清洁牙签,用钝端在自己口腔内腮面轻刮少许黏液,并弃掉。换牙签,在原位稍用力刮取上皮细胞,均匀涂在一张干净的载玻片中央。

用甲苯胺蓝(或亚甲蓝)染液染色5min,先在低倍镜下观察,可见视野中有许多单个或成

堆的被染成蓝色的细胞,即口腔黏膜上皮细胞。细胞呈多边形或椭圆形,细胞中央有一染成深蓝色的细胞核,核周围均质部分为细胞质,细胞外表有细胞膜(图 1-1-7)。

3. 长度测量

(1) 目微尺安装(见实验原理)。

(2) 将台微尺盖片面朝上放在载物台上,用低倍镜观察,调节焦距看清台微尺的刻度。这时目微尺和台微尺同时显示在视野中。

(3) 移动台微尺,同时转动目镜,使目微尺直线与台微尺直线尽量靠近平行,并将两尺的“0”点刻度线或某刻度线对齐。然后从左向右查看两尺刻度线另一重合处,记录重合线间目微尺和台微尺各自包含的格数,根据公式即可计算出目微尺每个小格代表的实际长度。公式如下:

$$\text{目微尺每小格代表的实际长度}(\mu\text{m}) = \frac{\text{两重合线间镜台测微尺格数}}{\text{两重合线间目镜测微尺格数}} \times 10(\mu\text{m})$$

(4) 移去台微尺,换血涂片,用目微尺测量细胞所占小格数并乘以目微尺每小格代表的实际长度,即为被测细胞的实际长度(图 1-1-8)。

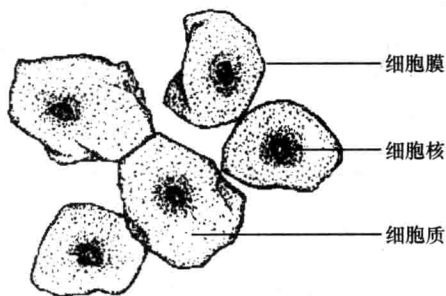


图 1-1-7 人口腔黏膜上皮细胞

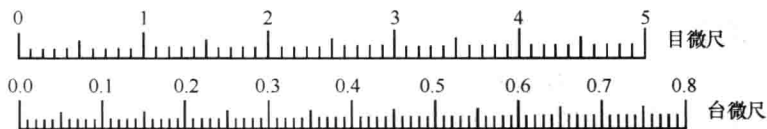


图 1-1-8 显微测量原理示意图

(5) 测量结果计算:球形细胞的体积 $V = 4\pi r^3/3$ (r 为半径);椭球形: $V = 4\pi ab^2/3$ (a 、 b 为半长轴和半短轴);核质比 $NP = V_n/(V_c - V_n)$, V_c 为细胞体积, V_n 为细胞核体积。

【实验结果观察】

(1) 标定并记录低倍镜和高倍镜下目微尺的每小格代表的实际长度。

(2) 在观察口腔黏膜上皮细胞和蟾蜍血细胞时,测量这两种细胞。记录被测细胞及细胞核的长短径。

【注意事项】

(1) 如果需换用高倍镜或油镜测量时,要用同样的方法重新计算高倍镜或油镜下目微尺每小格的实际长度。

(2) 在测量时要注意将被测物体放在视野中央,因为该位置镜像最清晰,相差最小。

(3) 每一种被测物体(细胞)需反复测量数个或数十个,求其平均值。

(4) 台微尺刻度是用加拿大树胶和圆形盖玻片封合的。当清洗香柏油时,不宜使用过多的二甲苯,以避免盖玻片下的树胶溶解。

(5) 取出目微尺,将目镜放回镜筒,用擦镜纸擦去目微尺上的油渍和手印。

【实验报告】

(1) 用测微尺测量不同材料各种细胞的大小后,制表格表示测量结果。

(2) 测量 10 个蟾蜍红细胞的长短径,并求出体积的平均值填入表 1-1-1。

表 1-1-1 用测微尺测量后结果

细胞编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	范围	均值
细胞长径												
细胞短径												
细胞体积												

【思考问题】

- (1) 如何标定目镜测微尺?
- (2) 显微测微尺包括哪两个部件? 它们各起什么作用?
- (3) 在某台显微镜下用某一放大倍数的物镜,测得目微尺每格的实际长度后,当换一台显微镜用同样放大倍数的物镜测量时,该尺度是否还有效? 为什么?

(张明亮)

三、细胞计数和活力鉴定

【实验目的】

- (1) 掌握细胞计数的基本原理与方法。
- (2) 掌握细胞活力鉴定的基本原理与方法。

【实验原理】

细胞计数时,先将培养细胞或血细胞稀释成细胞悬液,然后将细胞悬液滴入细胞计数板内,对计数板上计数室四大格内的细胞进行计数。根据计数室的容积及稀释倍数,即可计算出细胞浓度。细胞计数的方法可以分为三大类:①用光学显微镜和血细胞计数器对细胞进行直接计数,又称为直接视觉法(direct vision method);②用光学显微镜和血细胞计数器对细胞核进行计数,又称间接视觉法(indirect vision method)计数;③用电子系统自动进行视觉计数。直接视觉方法是最常用的计数法。

细胞活力的鉴定在生物学和医学上具有很重要的意义。细胞培养过程中需要经常测定细胞的存活率,以便随时记录细胞的生长情况。在肿瘤细胞的研究中,为了检验各种药物对肿瘤细胞的杀伤力,需要测定肿瘤细胞的存活率。细胞活力的鉴定方法有多种,常用的有染色排除法和仪器分析法,染色排除法简便,易于操作,是最常用的细胞活性鉴定方法。如果通过直接的形态观察来鉴别细胞活力,实验结果容易受操作者的主观因素的影响,存在一定的误差。因此,在实际操作中常采用一些仪器来进行精确的批量检测。死细胞和活细胞膜的通透性不同,活细胞的细胞膜是一种选择性膜,对细胞起保护和屏障作用,只允许物质选择性地通过;细胞死亡之后,细胞膜受损,通透性增加。台盼蓝(trypsin blue)染色鉴别细胞活力的方法就是利用了这一性质。台盼蓝是一种阴离子型染料,不能透过完整的细胞膜。所以经台盼蓝染色后死亡细胞或受损细胞被染成蓝色,而活细胞不被着色。仪器分析法可避免操作者主观因素的影响,主要有微电极技术(利用死细胞和活细胞膜两侧电位的差异)、全自动分析细胞记数仪和流式细胞仪等,可