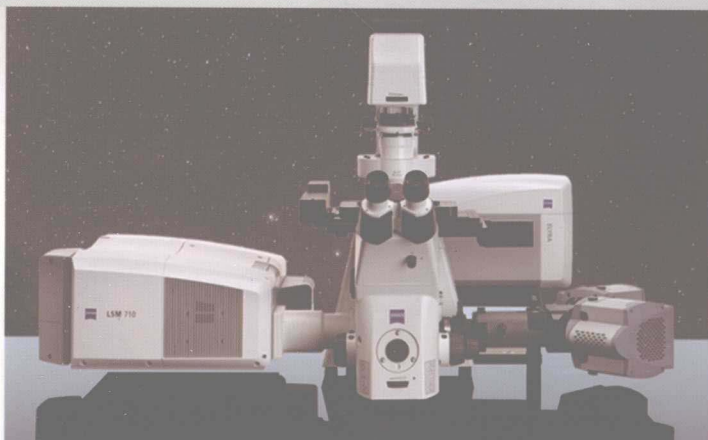


“十二五”国家重点图书出版规划项目

中国科学技术大学 **精品** 教材

细胞生物学实验

► 郭 振 编著



中国科学技术大学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
全国高等医药院校教材

细胞生物学实验

第二版



人民卫生出版社

“十二五”国家重点图书出版规划项目

中国科学技术大学 **精品** 教材

细胞生物学实验

Experimental Cell Biology

郭 振 编著

中国科学技术大学出版社



内 容 简 介

细胞生物学是现代生命科学的主干学科之一,主要研究细胞生命活动的基本规律。细胞生物学的研究和发展离不开细胞生物学实验技术的创新,因此学习和掌握细胞生物学的基本实验技术和新兴实验方法,对于细胞生物学研究非常重要。本书是在中国科学技术大学细胞生物学实验课程多年教学工作的基础上,参考其他相关教材和资料编写而成的,其内容主要包括光学显微镜的系统介绍及细胞生物学研究的相关实验,包括细胞的形态结构、细胞化学、染色体技术、细胞及组织培养技术和细胞工程技术 5 个方面的实验。通过学习具体实验原理及操作,提高学生思考问题及动手的能力,为后续的实验学习及科学研究打下坚实的基础。

本书可作为生物学专业及相关学科本科生、研究生的细胞生物学实验教材,也可作为相关技术工作者专业学习和研究的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验/郭振编著. —合肥:中国科学技术大学出版社,2012.7

(中国科学技术大学精品教材)

“十二五”国家重点图书出版规划项目

ISBN 978-7-312-03023-9

I. 细… II. 郭… 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(2012)第 126162 号

中国科学技术大学出版社出版发行

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

<http://press.ustc.edu.cn>

中国科学技术大学印刷厂印刷

全国新华书店经销

开本:787 mm×1092 mm 1/16 印张:9.75 插页:7 字数:255 千

2012 年 7 月第 1 版 2012 年 7 月第 1 次印刷

印数:1—3000 册

定价:20.00 元

总 序

2008年,为庆祝中国科学技术大学建校五十周年,反映建校以来的办学理念和特色,集中展示教材建设的成果,学校决定组织编写出版代表中国科学技术大学教学水平的精品教材系列。在各方的共同努力下,共组织选题281种,经过多轮、严格的评审,最后确定50种入选精品教材系列。

五十周年校庆精品教材系列于2008年9月纪念建校五十周年之际陆续出版,共出书50种,在学生、教师、校友以及高校同行中引起了很好的反响,并整体进入国家新闻出版总署的“十一五”国家重点图书出版规划。为继续鼓励教师积极开展教学研究与教学建设,结合自己的教学与科研积累编写高水平的教材,学校决定,将精品教材出版作为常规工作,以《中国科学技术大学精品教材》系列的形式长期出版,并设立专项基金给予支持。国家新闻出版总署也将该精品教材系列继续列入“十二五”国家重点图书出版规划。

1958年学校成立之时,教员大部分来自中国科学院的各个研究所。作为各个研究所的科研人员,他们到学校后保持了教学的同时又作研究的传统。同时,根据“全院办校,所系结合”的原则,科学院各个研究所在科研第一线工作的杰出科学家也参与学校的教学,为本科生授课,将最新的科研成果融入到教学中。虽然现在外界环境和内在条件都发生了很大变化,但学校以教学为主、教学与科研相结合的方针没有变。正因为坚持了科学与技术相结合、理论与实践相结合、教学与科研相结合的方针,并形成了优良的传统,才培养出了一批又一批高质量的人才。

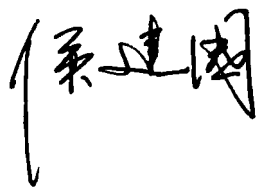
学校非常重视基础课和专业基础课教学的传统,也是她特别成功的原因之一。当今社会,科技发展突飞猛进、科技成果日新月异,没有扎实的基础知识,很难在科学技术研究中作出重大贡献。建校之初,华罗庚、吴有训、严济慈等老一辈科学家、教育家就身体力行,亲自为本科生讲授基础课。他们以渊博的学识、精湛的讲课艺术、高尚的师德,带出一批又一批杰出的年轻教员,培养了一届又一届优秀学生。入选精品教材系列的绝大部分是基础课或专业基础课的教材,其作者大多直接或间接受到过这些老一辈科学家、教育家的教诲和影响,因此在教材中也贯穿着这些先辈的教育教学理念与科学探索精神。

改革开放之初,学校最先选派青年骨干教师赴西方国家交流、学习,他们在带回先进科学技术的同时,也把西方先进的教育理念、教学方法、教学内容等带回到中国科学技术大学,并以极大的热情进行教学实践,使“科学与技术相结合、理论与实践相结合、

教学与科研相结合”的方针得到进一步深化,取得了非常好的效果,培养的学生得到全社会的认可。这些教学改革影响深远,直到今天仍然受到学生的欢迎,并辐射到其他高校。在入选的精品教材中,这种理念与尝试也都有充分的体现。

中国科学技术大学自建校以来就形成的又一传统是根据学生的特点,用创新的精神编写教材。进入我校学习的都是基础扎实、学业优秀、求知欲强、勇于探索和追求的学生,针对他们的具体情况编写教材,才能更加有利于培养他们的创新精神。教师们坚持教学与科研的结合,根据自己的科研体会,借鉴目前国外相关专业有关课程的经验,注意理论与实际应用的结合,基础知识与最新发展的结合,课堂教学与课外实践的结合,精心组织材料、认真编写教材,使学生在掌握扎实的理论基础的同时,了解最新的研究方法,掌握实际应用的技术。

入选的这些精品教材,既是教学一线教师长期教学积累的成果,也是学校教学传统的体现,反映了中国科学技术大学的教学理念、教学特色和教学改革成果。希望该精品教材系列的出版,能对我们继续探索科教紧密结合培养拔尖创新人才,进一步提高教育教学质量有所帮助,为高等教育事业作出我们的贡献。



中国科学技术大学校长
中国科学院院士
第三世界科学院院士

前 言

细胞是生物体结构与功能的基本单位。细胞生物学是现代生命科学的主干学科之一,主要是从细胞的不同结构层次来研究细胞生命活动的基本规律。作为一门实验科学,细胞生物学的研究和发展离不开细胞生物学实验技术的创新,因此学习和掌握细胞生物学的基本实验技术和新兴实验方法,对于细胞生物学研究非常重要。

细胞生物学实验是生命科学学院专业基础课程,是为了配合细胞生物学的教学而开设的一门实验课程。细胞生物学实验由原理型、验证型和综合型等多层次实验内容构成,目的在于巩固和加深学生对细胞生物学知识的理解、了解并帮助学生掌握细胞生物学的基本实验技术和新兴实验方法,为将来学生在科研实验室中的独立研究打下坚实的基础。

本书是在中国科学技术大学细胞生物学实验课程多年教学工作的基础上,参考其他相关教材和内容编写而成的。全书包含6个章节和1个附录。“Seeing is believing”作为细胞生物学最重要的研究工具,本书第1章主要对光学显微镜的基础知识和应用进行系统的介绍,包括最新的超高分辨率显微镜和光诱导蛋白等,帮助学生了解并掌握最新的显微镜技术和应用方法。第2章到第6章为实验部分,包括细胞的形态结构、细胞化学、染色体技术、细胞及组织培养技术和细胞工程技术5个方面的实验,既有一些传统的实验,如叶绿体和线粒体的分离和活体染色等,又增设了一些包含现代细胞生物学技术的实验,如免疫荧光技术、电穿孔和电融合技术、流式细胞术等,帮助学生掌握细胞生物学实验的基本原理和操作过程,锻炼和培养学生从细胞生物学的角度考虑问题,增强学生的动手能力,为后续的实验课程和进一步的科学研究打下基础。

本书在编写过程中得到中国科学技术大学“国家理科基础科学研究与教学人才培养基地”建设基金、中国科学技术大学“国家级基础生物学教学团队”建设基金、中国科学技术大学实验教学改革项目基金资助,在此表示感谢。

由于编者水平有限,书中难免有不足之处,恳请广大读者批评指正。

编 者
2012年6月

编审委员会

主 任 侯建国

副主任 窦贤康 陈初升

张淑林 朱长飞

委 员 (按姓氏笔画排序)

方兆本 史济怀 古继宝 伍小平

刘 斌 刘万东 朱长飞 孙立广

汤书昆 向守平 李曙光 苏 淳

陆夕云 杨金龙 张淑林 陈发来

陈华平 陈初升 陈国良 陈晓非

周学海 胡化凯 胡友秋 俞书勤

侯建国 施蕴渝 郭光灿 郭庆祥

奚宏生 钱逸泰 徐善驾 盛六四

龚兴龙 程福臻 蒋 一 窦贤康

褚家如 滕脉坤 霍剑青

目 次

总序	(i)
前言	(iii)
第 1 章 光学显微镜的原理和应用	(1)
1.1 显微镜的发展历史	(1)
1.2 显微镜的构造	(2)
1.3 常用的光学显微镜	(5)
1.4 光学显微镜的应用	(29)
第 2 章 细胞的形态结构	(50)
实验 1 线粒体和叶绿体的活体染色	(50)
实验 2 植物细胞骨架的光学显微镜观察	(53)
实验 3 细胞骨架的免疫荧光显示(I)——动物细胞微管的观察	(55)
实验 4 细胞骨架的免疫荧光显示(II)——植物细胞微管的观察	(57)
实验 5 细胞的超微结构	(59)
第 3 章 细胞化学	(63)
实验 6 DNA 的细胞化学——Feulgen 反应	(63)
实验 7 RNA 的细胞化学——Brachet 反应	(65)
实验 8 细胞中多糖和过氧化物酶的定位观察	(66)
实验 9 细胞中酸性磷酸酶的定位观察	(69)
实验 10 细胞中碱性磷酸酶的定位观察	(70)
实验 11 动物细胞基因组 DNA 的提取	(72)
实验 12 植物细胞基因组 DNA 的提取	(74)
实验 13 细胞和组织总 RNA 的提取	(76)
第 4 章 染色体技术与核型分析	(79)
实验 14 植物染色体标本的制备和观察	(79)
实验 15 动物骨髓细胞染色体标本的制备	(81)
实验 16 人体外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备	(83)
实验 17 人类染色体 G 带技术	(85)
实验 18 植物染色体显带技术	(86)

第 5 章 细胞和组织培养技术	(88)
实验 19 植物组织培养技术	(88)
实验 20 原生质体的分离和培养	(94)
实验 21 植物体细胞杂交——原生质体的融合	(97)
实验 22 动物细胞原代培养	(98)
实验 23 传代细胞培养	(101)
实验 24 细胞的冻存与复苏	(103)
实验 25 培养细胞的形态观察和计数	(105)
实验 26 培养细胞生长曲线的绘制和分裂指数的测定	(109)
实验 27 细胞克隆形成实验	(111)
实验 28 细胞同步化	(113)
实验 29 细胞周期观察	(115)
实验 30 流式细胞仪检测细胞周期	(116)
实验 31 免疫荧光技术	(118)
实验 32 细胞凋亡的检测	(122)
第 6 章 细胞工程技术	(125)
实验 33 鸡血细胞的体外融合	(125)
实验 34 电融合技术	(127)
实验 35 磷酸钙介导的细胞转染	(128)
实验 36 脂质体介导的细胞转染	(130)
实验 37 电穿孔技术	(132)
实验 38 稳定细胞株融合的荧光观察	(133)
附录	(136)
参考文献	(145)
参考网址	(149)
彩图	(151)

第 1 章 光学显微镜的原理和应用

1.1 显微镜的发展历史

光学显微镜是利用一系列光学组件,按照特定的光学原理,将人眼不能分辨的微小物体放大成像并对细微结构进行分析的光学仪器。

早在公元前 1 世纪,人们就已发现通过球形透明物体去观察微小物体时,可以观察到放大的像,后来逐渐对球形玻璃表面能使物体放大成像的规律有了认识。英国的狄更斯(Digges)和荷兰的詹森父子(Hans and Zachrias Janssen)是早期最著名的开创者;1610 年,意大利物理学家伽利略(Galileo)制造出了具有物镜、目镜和镜筒的简单复式显微镜;1611 年,开普勒(Kepler)阐明了显微镜的基本原理;1628 年前后,舒纳(Scheiner)在开普勒设计的基础上制造出近代显微镜的原型。1665 年,英国物理学家胡克(R. Hooke)通过自己制造的能够放大 140 倍的显微镜(图 1.1),在观察软木塞时发现了许多小的蜂房状结构,称之为“细胞”;在胡克发现细胞后不久,荷兰的列文虎克(A. Van Leeuwenhoek)制造出放大率达到 270 倍的显微镜,实现了历史性的飞跃。他利用自己制造的显微镜广泛地观察研究微生物及血细胞等,并发现了细菌。显微镜的发明使人们对生物的认识进入了新的历史阶段。

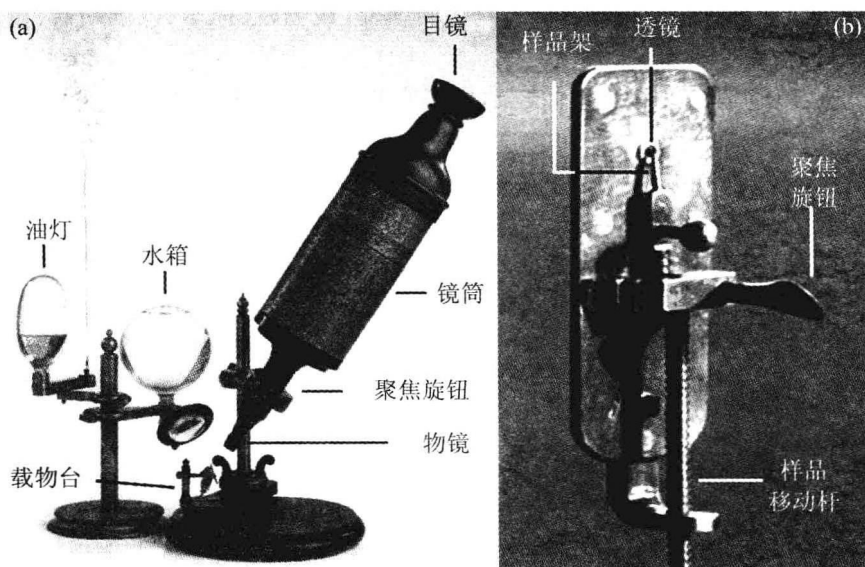


图 1.1 胡克的显微镜(a)和列文虎克的显微镜(b)

1864年前后,荷兰科学家惠更斯(Huygens)设计并制造出了结构简单、效果较好的双透镜目镜,惠更斯目镜现在仍广泛应用于各类普通显微镜上;1870年,德国物理学家阿贝(E. Abbe)系统地提出了显微镜的光学理论,并在显微镜的设计及光学玻璃制造等方面做了大量改进,发明了油浸物镜;1902年,艾夫斯(E. E. Ives)进一步对成像光路进行了改进,奠定了现代双目显微镜的研究基础;1932年,泽尼克(Zernike)发现相差原理并成功运用于显微镜上;1941年,德国蔡司(Zeiss)公司制造出第一台相差显微镜;1952年,诺玛斯基(Nomarski)发明微分干涉差光学系统。

古典的光学显微镜只是光学元件和精密机械元件的组合,它以人眼作为检测器来观察放大的像,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检测器。现代又普遍采用摄像机、CCD(charge-couple device,电荷耦合元件)和光电倍增管元件等作为显微镜的检测器,结合特定的控制软件,同电子计算机一起构成完整的图像信息采集和处理系统。随着科学技术的不断发展,光学显微镜的性能更加强大,成为细胞生物学研究中最重要工具。

1.2 显微镜的构造

普通光学显微镜分为机械装置和光学系统两大部分,通过这两部分的配合才能发挥显微镜的功能。

1. 显微镜的机械装置

显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、标本夹、推动器、粗动/微动调节螺旋等部件。

(1) 镜座:镜座是显微镜的基本支架,由底座和镜臂两部分组成。镜座上安装有载物台和镜筒,用来安装光学系统。

(2) 镜筒:镜筒两端分别装有目镜和转换器,形成目镜与物镜之间的暗室。从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的,所以镜筒长度的变化,不仅会改变放大倍率,而且还会影响成像质量,因此使用显微镜时,不能任意改变镜筒长度,显微镜的标准筒长为160 mm。

(3) 物镜转换器:物镜转换器上可安装多个物镜,普通光学显微镜一般装有4个物镜(放大倍率分别为 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$)。转动转换器可以将物镜和镜筒接通,从而与镜筒上面的目镜构成一个放大系统。

(4) 载物台:载物台上装有弹簧标本夹和推动器,可以用来固定和移动标本,使研究对象恰好位于目镜的视野中心。

(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。有的显微镜在纵横杆上刻有标尺,构成很精密的平面坐标系,方便标记样标本的位置。

(6) 粗动/微动螺旋:调节螺旋可以调节物镜和标本间距离。粗动螺旋只能粗略地调节焦距,要得到清晰的物像,需要用微动螺旋精细调节。

2. 显微镜的光学系统

显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、物镜和目镜等组成,光学系统对标本起放大作用,可以在眼睛或者检测系统中形成清晰的标本放大图像。

(1) 反光镜:较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体的,在镜座上装有反光镜。反光镜是由一个平面镜和一个凹面镜组成的,可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透镜的中央,照明标本。新型的显微镜镜座上装有光源,并有电流调节螺旋,可通过调节电流大小调节光照强度。

(2) 聚光器:聚光器由聚光透镜、光圈和升降螺旋组成,安装在载物台下,其作用是将反光镜反射的光线聚焦于标本上,从而得到最佳的照明效果。聚光器的高低可以调节,使反射光线的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 1.25 mm 处,而其上升限度为载物台平面下方 0.1 mm。因此,要求使用的载玻片厚度应在 0.8~1.2 mm 之间,否则焦点不能聚焦在被检标本上。

聚光器光圈也叫可变光阑,用来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。聚光器的大小影响成像的分辨率和反差效果,光圈开放过大会产生光斑;若光圈开放过小会降低分辨率。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器,常用的有阿贝聚光器、消色差聚光器和摇出聚光器 3 种。阿贝聚光器在物镜数值孔径高于 0.6 时会产生色差和球差;消色差聚光器对色差、球差和慧差的校正程度很高,非常适合明视场观察,但是不能用于 4× 以下的物镜;摇出聚光器能将聚光器透镜从光路中摇出,以满足低倍物镜照明的需要。

(3) 物镜:物镜是显微镜最重要的光学部件,决定了显微镜的分辨率和成像清晰度,是衡量一台显微镜质量的首要标准。物镜都是由若干个透镜依次排列而成的一个透镜组,可以克服单个透镜带来的像差和色差,提高成像的光学质量。物镜的数值孔径(numerical aperture, NA)大小决定了物镜的分辨能力及有效放大倍数。数值孔径越大,物镜的性能越好。

数值孔径的计算公式为: $NA = N \cdot \sin \alpha$, 其中 N 为物镜和标本之间填充介质的折射率, α 为物镜孔径角(图 1.2)。

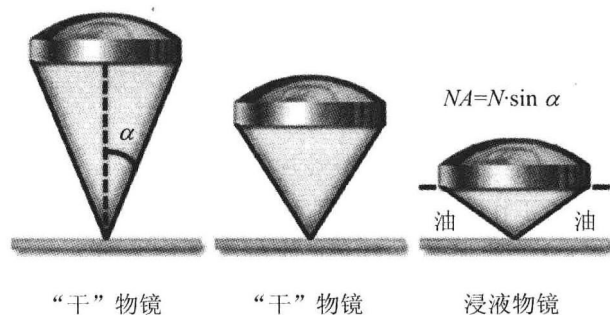


图 1.2 数值孔径与孔径角

孔径角指由标本上一点发出的进入物镜最边缘光线和进入物镜中心光线之间的夹角。

当用普通的中央照明(使光线均匀地透过标本的明视照明)时,物镜分辨率的计算公式为: $D = 0.61\lambda / NA$,其中 D 为物镜的分辨率, λ 为照明光线的波长, NA 为物镜的数值孔径。根据公式可以发现, λ 越短, NA 越大,物镜的分辨率越高。通常镜头的 NA 的最大值约为 1.5,可见光的平均波长约为 500 nm,根据公式可以得出普通光学显微镜的分辨率为 200 nm。

物镜有很多种分类方法,按像差校正程度不同,物镜可以分为:

(1) 消色差物镜:这种物镜可以校正轴点上红蓝光的色差和黄绿光的球差并消除近轴点的慧差,不能校正其他光的色差和球差,并且场曲很大,一般镜头上标有“Ach”字样。

(2) 半复消色差物镜:这种物镜可以校正红、蓝两色光的色差和球差,成像质量介于消色差物镜和复消色差物镜之间,一般镜头上标有“FL”字样。

(3) 复消色差物镜:这种物镜可以校正红、绿、蓝三色光的色差及红、蓝两色光的球差,并且有很高的数值孔径,成像的清晰度、色彩纯度、对比度及图像平直度都很高,是观察和显微照相用的一流物镜,一般镜头上标有“APO”字样。

(4) 平场物镜:这种物镜中有一块半月形的厚透镜,可以校正场曲,因为视场平坦,所以非常适合观察和显微照相,一般镜头上标有“PLAN”字样。通常会在各种消色差物镜的透镜组中加入校正场曲的透镜,这称为相应的平场消色差物镜。

按功能不同,物镜可以分为:

(1) 相差物镜:适用于观察无色透明的标本或活细胞,倒置显微镜上使用广泛,一般镜头上标有“Ph”(phase contrast)字样。

(2) DIC(differential interference contrast microscope)物镜:适用于观察无色透明的标本或活细胞,观察效果有一定的立体感,一般镜头上标有“DIC”字样。

(3) HMC(hoffman modulation contrast)物镜:适用于观察无色透明的标本或活细胞,观察效果立体感很强,但不能用于荧光观察,一般镜头上标有“HMC”字样。

(4) 偏光物镜:这种物镜装配了专门克服应力的设备,适用于偏光观察,一般镜头上标有“POL”(polarization)字样。

(5) TIRF(total internal reflection fluorescence)专用物镜:这种物镜的数值孔径相对较大,一般为 1.45~1.65,专门用于全内反射显微镜。

(6) 多功能物镜:这种物镜可以满足相差、DIC 和荧光观察的需要。

按工作距离不同,物镜可以分为:

(1) 普通物镜:工作距离短,仅适用于载玻片的观察。

(2) 长工作距离物镜:工作距离可以达到 10.6 mm,除了可以用于载玻片的观察,还可以用于培养皿、培养瓶等容器的观察,一般镜头上标有“LD”字样。

按物镜前透镜与被检物体之间的填充介质不同,可分为:

(1) 干燥物镜:这种物镜以空气为介质,放大倍数一般低于 40,数值孔径小于或等于 1。

(2) 油浸物镜:这种物镜以香柏油或甘油为介质,放大倍数一般高于40,数值孔径大于1,一般镜头上标有“OIL”字样。

(3) 水浸物镜:这种物镜以水或者水溶液为介质,多用于生理学(如脑片等)研究中较厚标本的观察,一般镜头上标有“W”字样。

(4) 目镜:目镜的主要作用是将由物镜放大所得的像再次放大,从而在明视距离处形成一个清晰的虚像。普通光学显微镜的目镜由两部分组成,位于上端的透镜称目透镜,起放大作用,位于下端的透镜称场透镜,主要使成像亮度均匀。在上下透镜的中间或下透镜下端有一个环状光阑,物镜放大后的像就落在该环状光阑平面处,因此可以在这个位置安装测微计、指针等附件。

根据结构差别,目镜分为很多种,如惠更斯目镜、补偿目镜、平场目镜等,需要按照具体研究需要选择相应的目镜以达到最佳的成像效果。

1.3 常用的光学显微镜

1.3.1 相差显微镜

荷兰科学家泽尼克于1932年发明相差显微镜(phase contrast microscope),并因此获1953年诺贝尔物理学奖。相差显微镜的最大特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。因细胞各部细微结构的折射率和厚度不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位发生变化(相位差),但这种相位差人眼无法观察。相差显微镜是通过改变这种相位差,并利用光的衍射和干涉现象,把相差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本的。相差显微镜和普通显微镜的区别是用环状光阑代替可变光阑。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能:① 将直射的光(视野中的背景光)与经物体衍射的光分开;② 将大约一半的波长从相位中除去,使之不能发生相互作用,从而引起强度的变化。

1. 相差显微镜的原理和结构特点

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。当光通过物体时,如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,因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位有变化(相应发生的差异即相位差),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,把透过标本的可见光的相位差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。图1.3为相差显微镜光路示意图,光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,同时延迟了 $\lambda/4$ (波长),如果再增加

或减少 $\lambda/4$, 则光程差变为 $\lambda/2$, 两束光合轴后干涉加强, 振幅增大或减小, 提高反差。通过调整相位差可以改变成像的效果, 得到正负相差的像(图 1.4)。

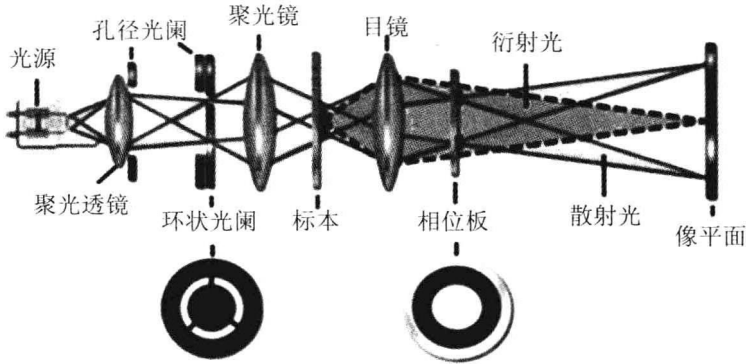


图 1.3 相差显微镜的光路示意图

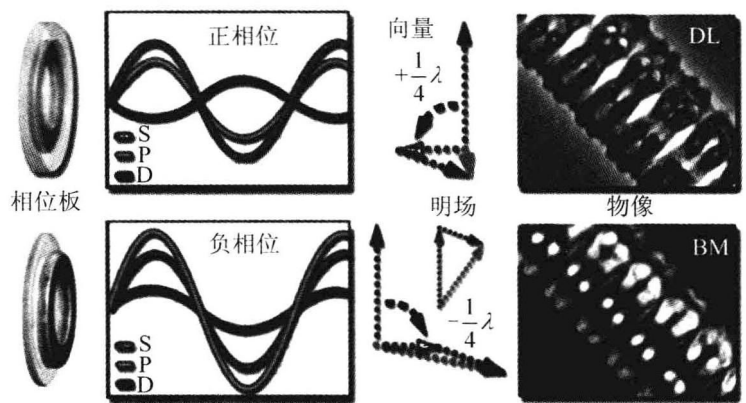


图 1.4 正负相差成像

相差显微镜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,并带有一个调整合轴用的望远镜。环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑,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旁像中分出来。相板安装在物镜的后焦面处,相板装有吸收光的吸收膜和推迟相位的相位膜。它除能推迟直射光线或衍射光的相位以外,还有吸收光使亮度发生变化的作用。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条直线上,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。

相差装置为多功能系列显微镜中的附属装置,一般与普通显微镜配合使用。

2. 相差显微镜的用途

相差显微镜适合用于观察组织培养中活细胞的形态结构。因活细胞无色透明,一般光镜下不易分辨细胞轮廓及其结构。相差显微镜的特点是将活细胞不同厚度及细胞内各种结构对光产生的不同折射作用转换为光密度差异(明暗差),使标本在显微镜下的结构反差明显,影像清晰。组织培养研究常用的是倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope),它的光源和聚光器在载物台的上方,物镜在载物台的下方,便于观察贴附在培养器皿底壁上的活细胞。

1.3.2 微分干涉显微镜

1952年,诺玛斯基在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉显微镜,即DIC显微镜。DIC显微镜又称Nomarski相差显微镜,是利用光的偏振原理工作的双光束干涉显微镜,其优点是能显示显微结构的立体图像。与相差显微镜相比,其标本可略厚一点,折射率差别更大,故图像的边缘清晰、轮廓突出、立体感更强,因此广泛应用于生物医学、材料科学等领域。

DIC显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜,技术设计要复杂得多,其光路如图1.5所示。DIC显微镜主要是利用偏振光成像,有四个特殊的光学组件:偏振器(polarizer)、DIC棱镜、DIC滑行器和检偏器(analyzer)。偏振器直接装在聚光系统的前面,使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了石英Wollaston棱镜,即DIC棱镜,此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光(x 和 y),二者成一小夹角。聚光器将两束光调整成与显微镜光轴平行的方向。最初两束光相位一致,在穿过标本相邻的区域后,由于标本的厚度和折射率不同,两束光产生了光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个Wollaston棱镜,即DIC滑行器,它把两束光波合并成一束。这时两束光的偏振面(x 和 y)仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置,即检偏器。在光束形成目镜DIC影像之前,检偏器与

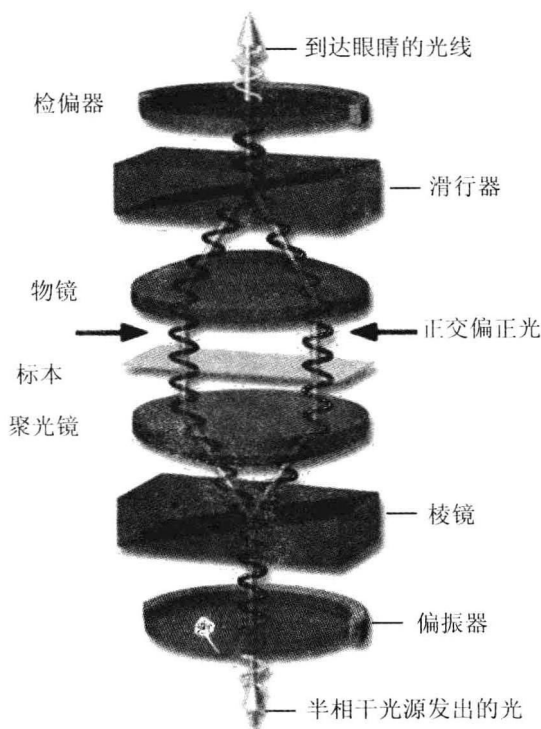


图 1.5 微分干涉显微镜的光路示意图

偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光,从而使二者发生干涉。 x 和 y 波的光程差决定着透光的多少。光程差值为0时,没有光穿过检偏