

国家级实验教学示范中心

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

总主编 徐 晨

人体显微形态学实验

第2版

王娅兰 汪维伟 主编



科学出版社

国家级实验教学示范中心
高等医药院校基础医学实验教学系列教材

总主编 徐 晨

人体显微形态学实验

第2版

主 编	王娅兰 汪维伟		
副主编	陈俊霞 廖晓岗 李泽桂 郭乔楠 彭惠民		
编 委	(按姓氏笔画排列)		
马 韵	广西医科大学	王小丽	华中科技大学同济医学院
王娅兰	重庆医科大学	王燕蓉	宁夏医科大学
文 彬	川北医学院	申丽娟	昆明医科大学
刘永刚	重庆医科大学	杨雅莹	重庆医科大学
李 丹	重庆医科大学	李 和	华中科技大学同济医学院
李 静	重庆医科大学	李泽桂	第三军医大学
李娜萍	华中科技大学同济医学院	吴 宏	重庆医科大学
汪维伟	重庆医科大学	沈新生	宁夏医科大学
陈俊霞	重庆医科大学	徐 晨	重庆医科大学
徐 曼	重庆医科大学	郭乔楠	第三军医大学
唐 勇	重庆医科大学	唐学清	泸州医学院
曹友德	重庆医科大学	章 为	四川大学华西医学中心
梁文妹	贵阳医学院	彭 彦	重庆医科大学
彭惠民	重庆医科大学	廖晓岗	重庆医科大学

科学出版社

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书为医学人体显微形态学实验教材,分为四篇。第一篇介绍了显微镜等形态学常用仪器的基本结构、原理、特点和使用,以及常用制片、染色等实验方法。第二篇为经典验证性实验,包括细胞生物学、组织学与胚胎学、病理学和医学遗传学的经典实验。第三篇为综合性形态学研究方法以及病理学和遗传学的病案分析讨论。第四篇为创新性实验,介绍了一些创新研究的思路和实验方法平台,以引导学生开展创新性实验。

本书供医学各专业层次的细胞生物学、医学遗传学、组织学、胚胎学、病理学等实验课程选择使用,也可作为医学研究生、进修生的参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

人体显微形态学实验 / 王娅兰,汪维伟主编. —2版. —北京:科学出版社,2013.6

国家级实验教学示范中心·全国高等医药院校基础医学实验教学系列教材
ISBN 978-7-03-037760-9

I. 人… II. ①王… ②汪… III. 人体形态学-显微术-实验-医药院校-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第123962号

责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:陈玉凤

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>

北京天时彩色印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年6月第 二 版 印张:19

2013年6月第七次印刷 字数:565 000

定价:78.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《高等医药院校基础医学实验教学 系列教材》编写指导委员会

- 主任** 雷 寒(重庆医科大学)
- 副主任** 董 志(重庆医科大学)
张绍祥(第三军医大学)
- 委 员** 王亚平(重庆医科大学)
李 和(华中科技大学同济医学院)
侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)
文 斌(川北医学院)
梁文妹(贵阳医学院)
李著华(泸州医学院)
范奇元(遵义医学院)
王燕蓉(宁夏医科大学)
罗殿中(广西医科大学)
- 总主编** 徐 晨(重庆医科大学)

总 序

传统医学实验教学的主要任务是让学生验证理论知识、增加感性认识,但缺乏对学生创新能力的培养,因而实验难度不高,实验条件比较简单。现代高等医学教育更加强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,充分认识并落实实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围。要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。要把学生从二级学科狭隘的“项目”实验教学提高到基于一级学科平台的“方法”实验教学,最大限度地拓展学生的专业视野。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,必将对现代医学实验教学提出更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然的趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系改革力度,改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理是提高医学实验教学质量的重要环节。这对培养适应 21 世纪医学卫生事业发展的高素质医学人才有重要意义。

围绕现代医学生的培养目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,重新构建新型基础医学实验教学体系的改革势在必行。要实现以上目标,除了对实验室进行整合外,其核心内容就是实验教学教材。为了能够编写出一套适合中西部地区高等医学院校医学教育现状的实验教学教材,2008 年,在科学出版社的大力支持下,《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会以重庆医科大学为主体,协同全国 26 所高等医学院相关专业的专家教授共同编写了这一套实验教学系列教材。时隔 4 年,为了进一步完善本套实验教材,我们对本套教材进行修订再版,全套共八本,包括《人体大体形态学实验(系统解剖学分册)》、《人体大体形态学实验(局部解剖学分册)》、《人体显微形态学实验》、《人体机能学实验》、《病原生物学与免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实验》、《医用化学实验》、《医用物理学实验》。

本系列实验教材的编写理念是将实验教学按照建设国家级实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照基础医学实验教学逻辑和规律,将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验等板块进行编写。

本系列教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合选修实验课程学分。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中可能存在偏颇之处,请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2012 年 10 月

第2版前言

《人体显微形态学实验》是基础医学教学的重要组成部分,课程涉及细胞生物学、遗传学、组织学、胚胎学、病理学等。实验技术涉及光镜和电镜下观察人体正常细胞、组织微细结构和病理改变所用的多种研究方法,如组织切片制作、免疫细胞化学、原位杂交、组织细胞培养、形态学定量分析等技术。适用于医学各专业层次的与细胞生物学、遗传学、组织学、胚胎学、病理学等有关的实验课程教学;也可作为医学研究生、进修生的参考教材。

在传统教学中,人体显微形态学实验所涉及的内容,主要为依附于相应理论课的验证性实验,由各教研室开设,缺乏学科间的交叉融合,不利于学生探索精神、科学思维和创新能力的培养。随着高等医学教育的不断深入,实验教学理念也发生了一系列深刻的变化。为加强实验教学在人才培养和教学工作中的地位,逐步形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围,尝试建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系。本书将以上课程一起综合编写,循序渐进,以介绍常用仪器及基本实验方法开始,从经典验证性实验、综合性实验到创新性实验,以期更好的组合教学资源,减少课程间的重复,增强创新性实验,有利于学生科学探索精神和创新能力的培养。

本书共分四篇,主要涉及的内容包括:

常用仪器及基本实验方法:主要介绍形态学常用仪器的基本结构、原理、特点和使用方法。培养学生掌握基本仪器的使用和基本实验方法的操作。

经典验证性实验:为传统形态学实验部分,基本按原有经典实验的编写方式。但加入了大量图片,增强形态学的可视性特点。每张切片或者标本观察后,留出空位,让学生自己总结形态特征或者诊断依据,培养学生的观察、分析能力。

综合性实验:包括综合性形态学的研究方法和病案综合讨论等。主要介绍研究方法的基本原理、实验步骤和应用。病案综合讨论主要引导学生综合分析,培养学生科学思维能力。

创新性实验:有两种方式。一是提供一些实验方法平台,让学生能利用它,设计研究自己观察、提出的问题。如某些理化因素对生殖与胚胎发生、肿瘤细胞的影响等。二是教师提出问题,或者学生自己发现问题。由学生查阅文献,提出实验设计。以培养学生创新思维能力和基本的医学科研能力。

本书的编写得到重庆医科大学各级领导以及多所医学院校同行专家的支持和帮助,特别是北京大学的唐军民教授热情提供了很好的胚胎学图片,同济医学院的汪薇曦、官阳、康学军等老师也提供了图片,在此向他们表示衷心的感谢。

《人体显微形态学实验》第1版的编写始于2007年秋,2008年夏正式出版。经过几年的教学实践,得到了广大师生的好评。在此基础上,第2版保持了一版的四篇结构和编排,只对部分章节进行了补充与修改,更换了部分图片和文字的修订,以期提高教材的实用性。

王娅兰 汪维伟

2013年2月20日

第1版前言

《人体显微形态学实验》是基础医学教学的重要组成部分,课程涉及细胞生物学、遗传学、组织学、胚胎学、病理学等。实验技术涉及光镜和电镜下观察人体正常细胞、组织微细结构和病理改变所用的多种研究方法,如组织切片制作、组织细胞化学、免疫细胞化学、原位杂交、组织细胞培养、显微摄像等。

在传统教学中,人体显微形态学实验所涉及的内容,主要为依附于相应课程理论教学的验证性实验,由各教研室开设,缺乏学科之间的交叉融合,不利于培养学生探索精神、科学思维 and 创新能力。随着高等医学教育的不断深入,实验教学的理念也发生了一系列深刻的变化。为加强实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,逐步形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围,尝试建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系。本书将以上课程一起综合编写,循序渐进,以介绍常用仪器及基本实验方法开始,从经典验证性实验、综合性实验到创新性实验,以期更好地组合教学资源,减少课程间的重复,加强创新性实验,更有利于学生科学探索精神和创新能力的培养。

本书共分四篇,主要涉及的内容包括:

常用仪器及基本实验方法:主要介绍形态学常用仪器的基本结构、原理、特点和使用,以及常用的实验方法。培养学生掌握基本仪器的使用和基本实验方法的操作能力。

经典验证性实验:为传统形态学实验部分,基本按原有经典实验的编写方式。但加入适当的图片,增强形态学的可视性特点。每张切片或者标本观察后,让学生自己总结形态特征或者诊断依据,培养学生的观察、分析能力。

综合性实验:包括综合性形态学实验的研究方法和病案分析讨论等。主要介绍研究方法的基本原理、实验步骤和应用。病案分析讨论旨在引导学生综合应用所学知识,培养学生科学思维能力。

创新性实验:有两种方式。一是提供一些实验方法平台,让学生能利用它,自己设计研究课题。二是教师提出问题,或者学生自己发现问题。由学生查阅文献,提出实验设计。培养学生创新思维能力和基本的医学科研能力。

本书力图体现更新教育思想,转变教育观念,以满足实验教学课程体系改革的目标。适用于医学各专业层次的与细胞生物学、遗传学、组织学、胚胎学、病理学等有关的实验课程教学,也可作为医学研究生、进修生的参考教材。

本书的编写得到了重庆医科大学各级领导以及多所医学院校同行专家、教授的支持和帮助,特别是北京大学的唐军民教授热情提供了很好的胚胎学图片,还有同济医学院的汪薇曦、官阳、康学军等老师提供了图片,在此向他们表示衷心的感谢。

由于我们的理念及学识有限,编写的时间也较匆促,疏漏与错误在所难免,欢迎同行专家和广大师生指正和提出宝贵意见,以期今后进一步修订和完善。

汪维伟 王娅兰
2008年2月25日

目 录

第一篇 常用仪器及基本实验方法

第 1 章 显微镜的结构和使用	(1)
第一节 普通光学显微镜的结构和使用	(1)
第二节 荧光显微镜的结构和使用	(4)
第三节 倒置相差显微镜的结构和使用	(5)
第四节 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理和应用	(6)
第五节 电子显微镜的基本原理及应用	(8)
第六节 数码显微互动教学系统的使用与数码显微摄像	(10)
第 2 章 基本实验方法	(12)
第一节 病理大体标本的取材	(12)
第二节 组织切片制作与 HE 染色	(13)
第三节 组织化学与细胞化学技术	(15)
第四节 免疫组织化学技术	(20)
第五节 原位杂交技术及其应用	(27)
第六节 组织细胞培养技术	(30)
第七节 显微测量与显微切割	(34)
第八节 常用电镜技术及标本的制备	(36)

第二篇 经典验证性实验

第 1 章 细胞生物学	(39)
第一节 细胞形态结构与几种细胞器的光镜观察	(39)
第二节 细胞骨架的光学显微镜观察	(41)
第三节 线粒体和液泡系的活体染色	(42)
第四节 正常细胞超微结构及主要超微结构病变	(43)
第五节 细胞分裂	(46)
第六节 细胞膜通透性的观察	(49)
第七节 小鼠巨噬细胞吞噬实验	(50)
第八节 鸡血细胞的体外融合	(51)
第 2 章 组织学与胚胎学	(52)
第一节 上皮组织	(52)

第二节	固有结缔组织	(55)
第三节	软骨、骨组织与骨发生	(59)
第四节	血液与血细胞发生	(62)
第五节	肌组织	(65)
第六节	神经组织	(67)
第七节	神经系统的组织结构	(72)
第八节	皮肤的组织结构	(75)
第九节	循环系统的组织结构	(77)
第十节	内分泌系统	(80)
第十一节	免疫系统	(83)
第十二节	消化管的组织结构	(87)
第十三节	消化腺的组织结构	(92)
第十四节	呼吸系统的组织结构	(96)
第十五节	泌尿系统的组织结构	(98)
第十六节	男性生殖系统的组织结构	(101)
第十七节	女性生殖系统的组织结构	(103)
第十八节	眼与耳的组织结构	(105)
第十九节	人胚胎的早期发生	(108)
第二十节	胎膜与胎盘	(113)
第二十一节	颜面的发生	(115)
第二十二节	消化系统和呼吸系统的发生	(119)
第二十三节	心血管系统的发生	(123)
第二十四节	泌尿系统和生殖系统的发生	(128)
第二十五节	神经系统与眼、耳的发生	(132)
第3章	病理学	(136)
第一节	细胞、组织的适应和损伤	(136)
第二节	损伤的修复	(144)
第三节	局部血液循环障碍	(146)
第四节	炎症	(152)
第五节	肿瘤	(159)
第六节	心血管系统疾病	(167)
第七节	呼吸系统疾病	(173)
第八节	消化系统疾病	(179)
第九节	淋巴造血系统疾病	(187)
第十节	泌尿系统疾病	(190)
第十一节	骨关节疾病	(196)
第十二节	生殖系统和乳腺疾病	(198)
第十三节	内分泌系统疾病	(204)

第十四节 神经系统疾病	(209)
第十五节 传染病	(213)
第十六节 寄生虫病	(222)
第4章 医学遗传学	(226)
第一节 人类皮肤纹理观察与分析	(226)
第二节 人类遗传性状的观察分析	(229)
第三节 人类染色体标本的制备	(230)
第四节 人类染色体非显带核型分析	(235)
第五节 人类染色体 G 显带标本的制备与分析	(238)

第三篇 综合性实验

第1章 形态学定量分析	(241)
第一节 正常与肿瘤组织细胞的显微图像分析	(241)
第二节 脑发育和衰老的体视学分析	(243)
第三节 肿瘤微血管构筑异质性与正常组织微血管形态观察	(246)
第2章 动物实验	(248)
第一节 血液循环与空气栓塞	(248)
第二节 肾脏血管分布特点与肾缺血性梗死	(248)
第三节 大脑皮质的结构特点与动物脑缺血模型制作	(249)
第四节 病原微生物感染与炎症的发生	(250)
第五节 胃黏膜屏障结构与胃溃疡	(251)
第六节 精子的超微结构和精子运动的观察	(252)
第七节 肿瘤肺转移动物模型的建立及观察	(254)
第3章 疾病分析与诊断	(256)
第一节 非肿瘤性疾病	(256)
第二节 肿瘤性疾病	(260)
第三节 DNA 损伤与遗传性疾病	(262)

第四篇 创新性实验

第1章 生殖与胚胎发生	(269)
第一节 精子活性影响因素的实验设计	(269)
第二节 影响卵泡发育因素的实验设计	(269)
第三节 新避孕节育方法的实验设计	(270)
第四节 现代生活方式中影响胚胎发育因素的实验设计	(270)
第五节 致孕鼠流产和死胎环境因素的实验设计	(270)
第六节 小鼠胚胎干细胞体外神经分化及其应用设计	(271)

第七节 小鼠全胚胎培养与致畸因素的实验设计	(273)
第八节 鸡胚培养与致畸实验	(276)
第2章 组织损伤与修复	(278)
第一节 环境污染对染色体致畸效应观察	(278)
第二节 药物致肿瘤细胞凋亡的实验设计	(279)
第三节 对肝脂肪变性影响的实验设计	(281)
第四节 影响白细胞渗出的实验设计	(281)
第五节 影响皮肤创伤愈合的实验设计	(282)
第3章 肿瘤细胞生物学行为与干预	(283)
第一节 抑制肿瘤细胞生长的实验设计	(283)
第二节 影响肿瘤细胞黏附的实验设计	(283)
第三节 影响肿瘤细胞侵袭的实验设计	(284)
第四节 干预肿瘤细胞转移的实验设计	(285)
第4章 基因与遗传	(287)
第一节 疾病家系收集和遗传分析	(287)
第二节 遗传咨询和家庭复发风险计算	(288)
第三节 微RNA 基因转染与遗传性疾病的研究	(289)
第四节 恶性肿瘤细胞基因突变筛查	(290)
第五节 遗传学标记与疾病的关联和连锁研究	(291)
第六节 后基因组时代生物医学展望	(291)

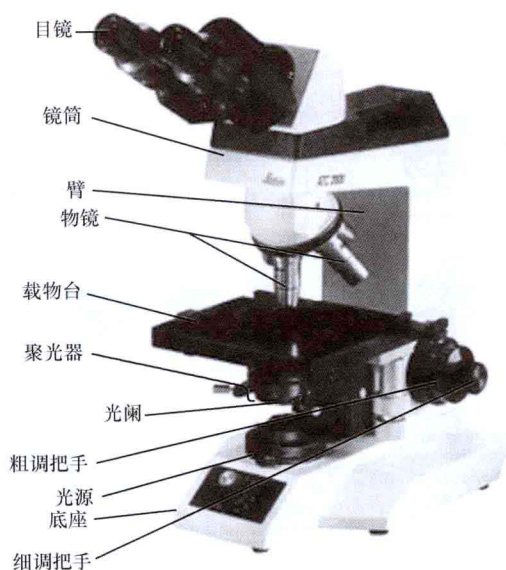


图 1.1.1-1 光学显微镜的构造

野。调焦装置是调节物镜和标本间距离的调焦把手(调焦轮),分粗调焦轮和细调焦轮。转动调焦轮可上下移动载物台,从而调节焦距,得到清晰的图像。

(二) 光学系统

目镜:装于镜筒上端,由两块透镜组成。目镜的作用是把物镜放大的实像再放大一次,不增加分辨率,观察者通过目镜看到物像。目镜内有上端的一块“接目镜”和下端的一块“场镜”。上下透镜之间或在两个透镜的下方,装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”,物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处,其上可安置目镜测微尺。目镜上面一般标有 $7\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等放大倍数,可根据需要选用。目镜的放大倍数过高,反而影响图像的清晰度。双目的显微镜中左侧的目镜可转动调节该目镜的屈光度,以备在两眼视力不同的情况下调节使用。

物镜:物镜安装在转换器上,对物体的图像作第一次放大,是决定成像质量和分辨能力的重要部件。物镜上常标有的 NA 为数值孔径, \times 为放大倍数, $160/0.17$ 分别表示镜筒长度(mm)和所需盖玻片厚度(mm)。标本的放大主要由物镜完成,物镜放大倍数越大,它的焦距越短,物镜与玻片间的距离越小。显微镜的物镜通常用低倍物

镜(16mm , $10\times$)、高倍物镜(4mm , $40\sim 45\times$)和油镜(1.8mm , $95\sim 100\times$)三种。

聚光器:可将光源汇聚成光锥照射标本,增强照明度和造成适宜的光锥角度,提高物镜的分辨力。聚光器由聚光镜和虹彩光圈组成。聚光镜的数值孔径可大于1,当使用大于1的聚光镜时,需在聚光镜和载玻片之间加香柏油,否则只能达到1.0。虹彩光圈由薄金属片组成,中心形成圆孔,推动把手可随意调整光圈的大小。调节光圈或者上下移动聚光镜,均可改变光的强弱。有的聚光器上有刻度,根据所使用物镜的 NA 值 $\times 80\%$ 的数字来调整刻度,可得到更清晰的图像。

光源:新式的显微镜的光源通常是安装在显微镜的镜座内,通过按钮开关来控制。

滤光片:可见光由波长不同的各种颜色的光组成,如只需某一波长的光线时,就要用滤光片。在聚光器下加适当的滤光片可以提高分辨力,增加影像的反差和清晰度。滤光片有紫、青、蓝、绿、黄、橙、红等各种颜色,分别透过不同波长的可见光,可根据需要选用。

二、显微镜的分辨率

显微镜受分辨率的限制,不能无限放大图像,过分放大的图像不清晰。分辨率(resolution power)是可分辨的两个点间的最小距离,用 R 表示。

$$R = \frac{\lambda}{2NA}$$

式中 λ 为所用光源的波长, NA 为物镜的数值孔径。由此可见,减小波长或者加大物镜的数值孔径均可提高显微镜的有效分辨率。紫外光的波长小于可见光,故紫外光显微镜的分辨率高于普通显微镜。此外,物镜的数值孔径受光的折射介质影响,标本与物镜间以空气为介质时, $NA=0.87$;以水为介质时, $NA=1.15$;以香柏油为介质时, $NA=1.32$ 。所以使用油镜时,标本与物镜间的香柏油能提高 NA ,观察到更清晰的图像。

【实验器材】

蛙血涂片、人精子涂片;香柏油、乙醇-乙醚混合液;显微镜、擦镜纸、吸水纸等。

【实验方法】

显微镜下观察标本切片的基本程序依次是显微镜的准备、标本的肉眼观察、低倍镜、高倍镜和油镜观察,这样才能有效、快速的完成实验,油镜很少用到。本节在观察蛙血涂片的同时学习显微镜的使用。

1. 显微镜的准备

(1) 从显微镜柜或镜箱内拿出显微镜时,要用右手紧握镜臂,左手托住镜座,平稳地将显微镜搬运到实验桌上。将显微镜放在自己身体的左前方,离桌子边缘约5~10cm,右侧可放记录本或绘图纸。

(2) 转动粗调螺旋,使镜筒上升,转动物镜转换器,使低倍镜对准镜台的通光孔(对准时有碰叩声)。可通过调节电流旋钮、光圈的大小、升降聚光镜来调节光照强弱。

2. 标本的肉眼观察 此步主要观察切片上标本的大小、外形、在切片上的位置以及大标本上要观察的部位,以便于镜下观察。例如:胃切片上色深的黏膜在标本的下部,红色的肌层在上部。由于显微镜下为倒置的图像,故在镜下观察时,要在切片的上部去寻找黏膜。

3. 低倍镜观察

(1) 置片:将切片标本有盖玻片的一面朝上,标签在左侧,放在镜台上的标本卡内,将其左边向外拉开,再轻轻弹回,卡住固定好标本。注意,切勿向上拉开弹簧夹片,压在标本上。然后转动标本推动器旋钮,使玻片上要观察的标本对准通光孔中央。镜台上的刻度可以标示玻片的坐标位置。

(2) 调焦:调节粗调焦轮升降载物台,使物镜距玻片标本0.5mm左右。注意:必须同时从显微镜侧面观察物镜与玻片的距离,以防镜头碰撞玻片造成损坏。用左眼从目镜上观察,同时缓慢下降镜台,直到视野中出现清晰的物像为止,再根据需要调整物像的位置和视野的亮度。若调节焦距时,镜台下降已超过工作距离(>5.40mm)而未见到物像,则应重新操作。反复练习上述各操作步骤,做到迅速熟练地找到标本以及光亮度的调节。

使用双目显微镜时,先调两个目镜筒间的距离(瞳距),双眼看到一个明亮的圆形视野即可。调焦时,先闭左眼,转动调焦轮调节到右眼焦距

清楚;闭右眼,转动左目镜的镜筒至焦距清楚,双眼的焦距就一致了。

(3) 观察:低倍镜主要观察标本的基本形态,寻找要观察结构的部位及其比邻关系,为高倍镜观察奠定基础。如胃的黏膜层、肌层,其间为黏膜下层,胃黏膜层的上皮和腺体的形态等。低倍镜下找到要观察的标本结构或者细胞后,将其移至视野正中(高倍镜的视野范围),同时调节到最清晰程度,换高倍镜观察。

4. 高倍镜观察 在低倍物镜观察的基础上直接转换高倍物镜到通光孔,除个别维修配置的物镜外,一般高倍镜不会碰到切片。低倍镜调好焦距后转换到高倍镜,镜下已见物象,只要稍微转动细调焦轮(一定不能用粗调焦轮),即可见清晰的物像。一般低倍镜选择要观察的标本结构或者细胞在视野内,即可仔细观察。否则,应重复低倍到高倍的切换操作。高倍镜能较清楚地看到切片中的组织结构或者细胞的光镜形态。在高倍镜下的蛙血红细胞呈椭圆形,外被细胞膜,膜内为浅红色细胞质,中央有一圆形呈蓝紫色的细胞核。

5. 油镜的使用

(1) 使用油镜之前,必须先经低、高倍镜观察,然后将需油镜观察的细胞移到视野的中心,并调好焦距。因为油镜需光线强,要将聚光器上升到最高位置,光圈开到最大。

(2) 转动转换器,直接移动高倍镜头离开通光孔,在需观察部位的玻片上滴加一滴香柏油,然后慢慢转动油镜到通光孔,使镜头浸入油中。眼睛观察目镜,并慢慢转动细调焦轮至物像清晰为止。如果不出现物像或者目标不理想要重找,要擦去玻片上的油,重新按低倍→高倍→油镜程序操作。

(3) 油镜使用完毕,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擦去镜头上残留油迹,最后再用擦镜纸擦拭2~3下即可(注意向一个方向擦拭)。观察结束后,用擦镜纸轻拭去标本上的油,再用滴有二甲苯的擦镜纸轻轻擦拭至干净为止。

6. 注意事项及光学仪器保养与清洁要点

(1) 使用结束后,关闭电源。将物镜移离通光孔,将载物台下降至最低,降下聚光器。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。

(2) 若发现显微镜有缺损,应立即报告老师。

(3) 不要随意取下目镜,以防止尘土落入物镜,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,也不要任意拆卸各种零件,以防损坏。

【作业与思考】

(1) 使用显微镜时,可以通过什么操作来调节光亮度和焦距?

(2) 观察标本时,为什么要用肉眼、低倍镜、高倍镜、油镜观察的步骤?

(3) 油镜与普通物镜在使用方法上有何不同?应特别注意些什么?

(4) 显微镜观察图像的放大倍数是如何计算和表示的?

(陈俊霞)

第二节 荧光显微镜的结构和使用

【实验原理】

荧光显微镜的原理是利用一个高效发光光源,经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光,激发检测样品内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后,再通过物镜和目镜进行放大观察。荧光显微镜主要用于细胞结构、功能及化学成分等的研究。

荧光显微镜由普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、荧光镜组件)组成,荧光显微镜的结构如图 1.1.2-1。荧光光源一般采用超高压汞灯,该灯可发出各种波长的光,因每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长,所以需加用激发滤片(一般有紫外、紫色、蓝色和绿色激发滤片),仅使一定波长的激发光经物镜照射到标本上。当观察样本中的荧光物质被激发光照射后,在极短时间内发射出较照射波长更长的荧光(可见光)。荧光具有专一性,一般都比激发光弱,为能观察到专一的荧光,需在物镜后面加阻断滤片。阻断滤片的作用有二:一是吸收和阻挡激发光进入目镜,以免干扰荧光和损伤眼睛;二是选择并让特异的荧光透过,以显示出专一的荧光色彩。激

发滤片和阻断滤片必须选择配合使用。

通过反射荧光装置使激发光经物镜向下落到射到标本表面,样品所产生的荧光以及由物镜透镜表面、盖玻片表面反射的激发光同时进入物镜,返回到双色束分离器,使激发光和荧光分开,残余激发光再被阻断滤片吸收。换用不同的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的组合插块,就可满足不同荧光反应产物的需要。

【实验方法】

(1) 打开电源开关,等超高压汞灯弧光到稳定状态。

(2) 根据样品的荧光指示剂,在光路的插槽中插入所要求的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的插块。即旋转荧光组件室数码圆盘,分别对应以下标志:

WB——适用于 FITC 荧光抗体染色的样品观察,阳性染色为绿色。

WG——适用于 PE 或 Cy3 荧光抗体和罗丹明染色的样品观察,阳性染色为红色。

WU——适用于紫外光荧光染色的样品观察,阳性染色为蓝色。

(3) 将荧光指示剂标记好的样品放在载物台上。

(4) 将物镜放在光路中聚焦样本,并按需要选择 ND 滤光片。

(5) 用低倍镜观察,根据不同型号荧光显微镜的调节装置,调节视场光阑和孔径光阑,使光源中心位于照明光斑的中央,整个视野亮度均一。

(6) 开始镜下观察标本。

【注意事项】

(1) 荧光几乎都较弱,应在较暗的室内进行观察。

(2) 未装滤光片不要用眼直接观察,以免损伤眼睛。

(3) 用油镜观察标本时,一定要用“无荧光油”。

(4) 高压汞灯关闭后不要立即重新打开,需经 5 分钟后才能再启动,否则会影响汞灯寿命。

(5) 如果长时间使用高倍镜观察,会发生荧光衰减,导致荧光图像反差减弱。使用 ND 滤光片或孔径光阑稍稍减少激发光强度,就能缓解样品荧光的衰减。

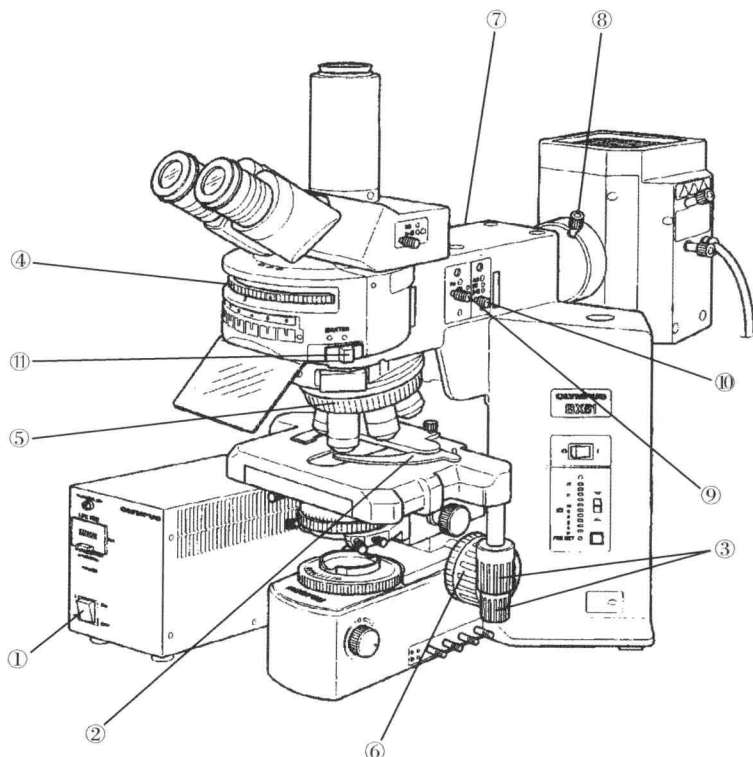


图 1.1.2-1 荧光显微镜的结构

- ①主开关;②样品夹;③X轴、Y轴旋钮;④荧光组件室;⑤物镜转换器;⑥粗调/微调旋钮;
⑦ND滤光片;⑧集光透镜聚焦钮;⑨视场光阑旋钮;⑩孔径光阑旋钮;⑪挡板旋钮

(6) 根据所用的荧光染料选择与之匹配的荧光组件;以 OLYMPUS 反射荧光装置为例,通常采用宽波长(W)。当荧光亮度极弱时,使用超宽带(SW)激发。如果样品自发荧光很强,则使用窄带激发(N)(表 1.1.2-1)。

表 1.1.2-1 所用不同荧光材料的激发光和发射光波长及滤光镜选择

荧光染料	激发波长(nm)	发射波长(nm)	适用激发光
FITC	490	520	B, IB
Rhodamine	511	572	G, IG
Texas Red	596	620	IY
Cy3	515	570	B, BV
DAPI	345	455	U
PI	530	615	IB, G, IG

(徐曼)

第三节 倒置相差显微镜的结构和使用

【实验目的】

- (1) 了解并掌握倒置相差显微镜的构造及原理。
- (2) 熟练掌握其操作方法和应用领域。

【实验原理】

普通光镜一般不能分辨未染色细胞的细微结构,这是由于各细微结构的折光性很近似或对比度不够之故。相差显微镜的结构特点是:①装有大小不同环状光阑的聚光器。②物镜内装有位相板。③中心望远镜装置。环状光阑的作用是造成空心的光线锥,使直射光和衍射光分离。相板的作用是使直射光和衍射光发生干涉,导致相位差变成振幅差,使明暗反差加强,提高了标本内各种结构之间的对比度,使标本中的结构清

晰可辨,故而可用于观察生活细胞或未经染色细胞的形态结构。

倒置相差显微镜用于观察生长在培养瓶中的生活细胞,它与相差显微镜基本相同,但物镜安装在载物台的下方,使物镜能聚焦到培养瓶底的生活细胞,还可以对体外培养细胞进行长时间观察、拍照、拍摄电影及录像等,以记录生活细胞的行为。由于工作距离的限制,倒置显微镜物镜的最大放大率为 $60\times$ 。一般研究用倒置显微镜都配有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 及 $40\times$ 相差物镜。

【实验器材】

培养瓶、皿或者培养板中的细胞。

【实验方法】

(1) 熟悉倒置显微镜物镜的基本部件。环状光阑与相板已调节好。

(2) 将培养瓶、皿或者培养板放置到载物台上,遵循先低倍、后高倍的原则进行观察。注意景深较长,调节焦距可看到不同焦距水平的细胞。

(3) 由于相位差增强了细胞核、细胞质等各部分的明暗反差,从而观察到明暗的图像(图 1.1.3-1)。



图 1.1.3-1 倒置显微镜下的间充质干细胞(高倍)

(陈俊霞)

第四节 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理和应用

激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)是20世纪80年代发展起来的高科技产品,是当今世界上最先进的分

子细胞生物学分析仪器之一。它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外或可见光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像,在亚细胞水平上观察诸如 Ca^{2+} 、pH、膜电位等生理信号及细胞形态的变化,成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具。由于它的高灵敏度和能观察空间结构的独特优点,对被检标本能够进行立体、断层扫描、动态的观察,因此在生命科学研究中得到迅速应用和发展。本节介绍 CLSM 的基本原理及构造,在生物研究中的主要应用和基本使用方法。

一、基本原理及构造

普通光学显微镜使用视场光源,标本上每一点的图像都会受到邻近点的衍射光或散射光的干扰,从而减低图像的清晰度,尤其是观察较厚的标本时,这种清晰度会严重降低。CLSM 由激光器发出激光,经过光的扩束和整形后变成一束平行光束,经过物镜聚焦到标本上,标本中的荧光物质在激光的激发下发出各个方向的荧光,一部分荧光经过物镜、长通分色镜、聚焦透镜会聚在聚焦透镜的焦点处,经过焦点处的针孔,由探测器接收并转变成电信号。只有在物镜的焦点处发出的荧光才能够到达探测器,其他非焦点处的荧光均被针孔阻挡掉。由于物镜和聚焦透镜的焦点在同一光轴上,因而称以这种方式成像的显微镜为共聚焦显微镜。针孔是共聚焦显微镜与普通光学显微镜最主要的区别,由于它的存在可以阻挡被测标本其他位置发出的荧光,它对图像的清晰度和分辨率有重要的影响。所以共聚焦光学系统由于使用照明点和探测点共轭这一独特结构,从而有效抑制同一焦平面上非测量点的杂散光以及不同光束中不同表面杂散光,大大减少测量的杂散光,有限度地改善横向分辨率,配合以高质量的物镜镜头和高灵敏度的电荷耦合器件(CCD)以达到极高的像素分辨率。同时由于使用共轭光路,使得来自标本的非焦平面光线不能进入探测器,从而也大大降低了非焦平面光线对图像的干扰,正是由于这一点使共聚焦光路具有了纵向分辨力。另外在显微镜的载物台上加一个微量步进马达,可使载物台上下步进移

动,则细胞或组织各个横断面的“光学切片”都能清楚地显示,获得“断层”图像,并可通过计算机软件重建立体结构。实行共轭光路激光扫描克服了普通共轭光路不能够对快速运动和变化的标本进行观察的缺陷,因而具备了时间分辨力。

CLSM的仪器主要由六部分组成:①计算机系统,涉及过程控制,数据采集和加工等;②激光照射系统,包括氩离子激光器和声光调节器;③显微镜系统,主要由倒置显微镜和共聚焦系统组成;④检测系统,由检测器、检测放大器 etc 元件组成;⑤X-Y平台系统;⑥Z-轴步进马达。

二、主要应用

(一) 图像处理

1. 组织光学切片 通过 CLSM 能获得普通光学无法达到的分辨率,同时具有深度识别能力(最大深度一般为 200 ~ 400 μm)及纵向分辨率,因而能看到较厚生物标本中的细节。它以一个微量步进马达(最小步距可达 0.1 μm)控制载物台的升降,可以逐层获得高反差、高分辨率、高灵敏度的二维光学横断面图像,从而对活的或固定的细胞及组织进行无损伤的系列“光学切片”,得到其各层面的信息。这种功能也被称为“显微 CT”。

2. 三维图像重建 CLSM 通过薄层光学切片功能,可获得标本的三维数据,经计算机图像处理及三维重建软件,沿 X、Y 和 Z 轴或其他任意角度来观察标本的外形及剖面,得到其三维立体结构,从而能十分灵活、直观地进行形态学观察,并揭示亚细胞结构的空间关系。

3. 细胞物理和生物化学测定 CLSM 可进行低光探测、活细胞定量分析和重复性极佳的荧光定量分析,从而能对单细胞或细胞群的溶酶体、线粒体、内质网、细胞骨架、结构性蛋白质、DNA、RNA、酶和受体分子等细胞特异结构的含量、组份及分布进行定性、定量、定时及定位测定;同时还可测定分子扩散、膜电位、氧化-还原状态和配体结合等生化反应变化程度。另外,CLSM 还可以对细胞的面积、平均荧光强度、积分荧光强度、细胞周长、形状因子及细胞内颗粒数等参数进行自动测定。

4. 荧光的定量、定位分析 CLSM 可对单标

记或双标记细胞及组织标本的共聚焦荧光进行定量分析,并显示荧光沿 Z 轴的强度变化;同时还可自动将荧光图像与象差图像重叠以显示荧光在形态结构上的精确定位。另外,借助于光学切片功能可在毫不损失分辨率的条件下测量标本深层的荧光分布。CLSM 也非常适用于高灵敏度的快速免疫荧光测定,可以准确监测抗原表达、荧光原位杂交斑点及细胞结合和杀伤的形态学特性并作定量分析。

5. Ca^{2+} 、pH 及其他细胞内离子的实时定量测定 利用 Fluo-3、Indo-1 等多种荧光探针,CLSM 可对细胞内各种离子(Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 Mg^{2+})和 pH 的比例及动态变化作微秒级(10^{-6})和毫秒级(10^{-3})实时定量分析,因此能完成活细胞生理信号的动态监测。

(二) 细胞生物学

1. 黏附细胞的分选 细胞分选是细胞培养中经常遇到的难题。CLSM 分选黏附细胞时可不改变细胞周围培养环境、细胞铺展程度和生长状态。常有两种方式:①激光消除法:在特制的培养皿上有两类细胞,一类是未做荧光染色的细胞群,另一类是做荧光染色的细胞群,利用高能激光把染色的细胞群杀死,而把未染色的细胞群保留并且继续培养。这种方式适用于数量较多细胞的分选。②Cookie Cutter 法:利用高能量激光于底部带膜的特制培养皿上,将欲选细胞周围切割成八角形,而非选细胞则因在该几何形状之外而被除去,它适用于选择数量较少的突变细胞、转移细胞和杂交瘤细胞。基于这两种方法,CLSM 能够做到:①总体扫描细胞群;②根据细胞物理和生化特性进行分选;③对以百万分之一几率发生的突变细胞进行筛选;④不改变细胞形态、类型和活性而克隆细胞;⑤分离细胞亚群以进行定量荧光分析;⑥自动储存细胞位置,以对特定细胞进行重复测定。

2. 激光细胞显微外科及光陷阱技术 CLSM 可将激光作“光子刀”,完成细胞膜瞬间穿孔,线粒体、溶酶体等细胞器烧灼,染色体切割,神经元突起切除等一系列细胞外科手术。

光陷阱技术是利用激光的力学效应,将一个微米级大小的细胞器或其他结构钳制于激光束的焦平面,也可称为光钳。利用光钳技术来移动细胞的微小颗粒和结构(如染色体、细胞器),可