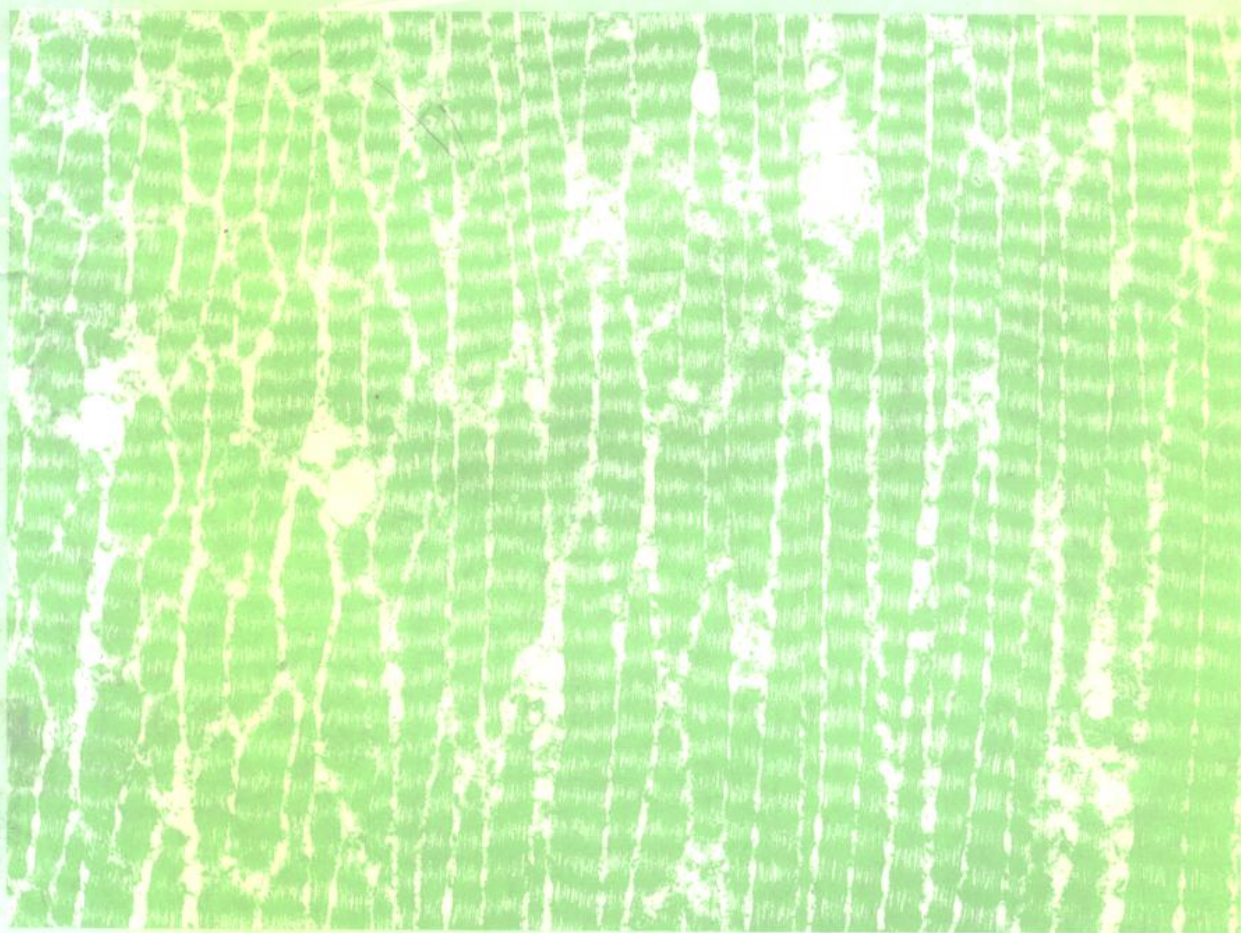


现代生物技术

张丰德 樊廷玉 主编



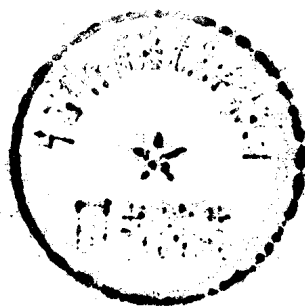
南开大学出版社

现代生物学技术

主编 张丰德 樊廷玉

编委 (以姓氏笔划为序)

王秀玲	王桂芬	刘桂琴	吕宪禹
侯文强	张丰德	岳慧琴	郭世宜
崔同昌	樊廷玉		



南开大学出版社

内 容 简 介

本书详细介绍了研究用显微镜、电镜、超显微结构制样、超速离心、紫外-可见分光光度法、红外分光光度法、荧光分光光度法、原子吸收光谱、扫描显微分光光度法、气相色谱、高效液相色谱、薄层色谱扫描、等电聚焦凝胶电泳、交变脉冲电场凝胶电泳等现代生物学技术的基本原理和实验方法。可作为生物系及有关专业本科生及研究生教材,也可供有关的科研人员参考。

现代生物学技术

张丰德等主编

南开大学出版社出版
(天津八里台南开大学校内)
邮编 300071 电话 3508542
新华书店天津发行所发行
天津宝坻县印刷厂印刷

1996年1月第1版 1996年1月第1次印刷

开本:850×1168 1/32 印张:23.25 插页:2

字数:597千 印数:1-1500

ISBN7-310-00870-7
Q·25 定价:23.80元

前 言

为了适应生物学的迅猛发展,培养通晓精密仪器、掌握现代技术的人才,于1980年在南开大学开设了现代生物学技术课程,积14年的教学和科研实践经验,逐步形成了这本教材的体系。它是以细胞生物学和生物化学目前常用的仪器为线索,以实践经验为主体,构成本教材的主要内容。其中大学本科生选修和研究生必修内容,实验已达百次以上,作为科研而建立的方法,绝大部分已在国内外刊物上发表。

全书共14章,含实验近百个,作为生命科学领域的教科书,原理部分以简单明了为宗旨,实验部分对每项实验方法的结果,属于定量分析的均列出了数据,供同行验证时参考。为了教学的需要,附有实际使用仪器的性能和操作方法,并在部分章节后选编了思考题。

本教材包括了大学本科生和研究生教学的全部内容,本科生使用时可根据生物学的发展,选学电镜、研究用显微镜、离心技术、紫外光谱技术、气相色谱技术等内容。研究生可根据细胞生物学和生物化学两大类型,系统地选用本书的实验内容。有的实验技术亦可为科研工作者借鉴。

本书由张丰德和樊廷玉主编,参加编写的人员有岳慧琴、郭世宣、王秀玲、侯文强、刘桂琴、宋玫雪、吕宪禹、崔同昌、王桂芬。书中的各章节都是由专门负责该种仪器的技术人员编写的,虽然都有10年以上的实践经验,但在技术发展的长河中,仍然是瞬间的沧海一粟,再加上水平有限,难免有错误和不妥之处,恳请读者批评指正。

张丰德

1994年12月

D80/3/15

目 录

第一章 研究用显微镜技术	(1)
§ 1.1 研究用显微镜的结构原理	(1)
§ 1.2 研究用显微镜的光学系统	(2)
1.2.1 显微镜的基本光学参数	(2)
1.2.2 光学透镜的象差	(3)
1.2.3 显微镜的光学系统	(4)
§ 1.3 研究用显微镜的种类	(6)
1.3.1 明视场显微镜	(6)
1.3.2 暗视场显微镜	(6)
1.3.3 相差显微镜	(7)
1.3.4 微分干涉差显微镜	(8)
1.3.5 偏光显微镜.....	(10)
1.3.6 荧光显微镜.....	(11)
§ 1.4 实验.....	(12)
1.4.1 明视场显微镜的观察方法.....	(12)
1.4.2 相差显微镜的观察方法.....	(13)
1.4.3 荧光显微镜的观察方法.....	(14)
1.4.4 DNA 的光学显微镜结构观察	(14)
1.4.5 淀粉粒的偏光显微镜观察.....	(15)
1.4.6 显微摄影技术.....	(16)
1.4.7 显微照片的半自动定量分析.....	(17)
思考题	(17)
参考文献	(18)
第二章 电子显微术	(19)
§ 2.1 透射电子显微镜.....	(19)
2.1.1 分辨能力和放大倍数.....	(19)
2.1.2 电子束及其形成.....	(21)
2.1.3 磁透镜.....	(22)
2.1.4 图像的反差形成原理.....	(26)
2.1.5 透射电子显微镜的仪器结构.....	(27)
2.1.6 透射电子显微镜的使用操作.....	(30)
§ 2.2 扫描电子显微镜.....	(34)

2.2.1	电子与样品的相互作用	(34)
2.2.2	扫描电子显微镜的成像原理	(36)
2.2.3	扫描电子显微镜的仪器结构	(37)
2.2.4	扫描电子显微镜的使用操作	(38)
§ 2.3	X 射线微区分析	(39)
2.3.1	X 射线的产生及其特性	(40)
2.3.2	X 射线的检测	(41)
2.3.3	X 射线微区分析的工作方法	(45)
2.3.4	X 射线微区分析在生物学中的应用	(46)
§ 2.4	扫描隧道显微镜	(47)
2.4.1	工作原理	(47)
2.4.2	在生命科学中的应用	(47)
§ 2.5	电子显微术在生命科学中的应用实例	(49)
2.5.1	用透射电镜观察超薄切片	(49)
2.5.2	不使用超薄切片的电镜技术	(49)
2.5.3	扫描电镜的应用	(49)
	思考题	(50)
	参考文献	(50)
	附录	(50)
第三章	超显微结构制样技术	(52)
§ 3.1	超薄切片技术	(52)
3.1.1	取材	(53)
3.1.2	固定	(54)
3.1.3	漂洗与脱水	(59)
3.1.4	渗透、包埋与聚合	(60)
3.1.5	超薄切片	(63)
3.1.6	超薄切片的染色	(65)
§ 3.2	实验	(67)
3.2.1	Formvar 支持膜的制备	(67)
3.2.2	动物样品包埋块的制备	(68)
3.2.3	植物样品包埋块的制备	(69)
3.2.4	超薄切片	(71)
3.2.5	超薄切片的染色	(73)
3.2.6	半薄切片的染色	(75)
§ 3.3	负染色技术	(77)
3.3.1	常用的负染色液	(77)
3.3.2	染色方法	(78)
3.3.3	负染色应注意的问题	(78)
§ 3.4	分子生物学电镜制样技术	(80)
3.4.1	核酸大分子电镜制样技术	(80)

3.4.2	蛋白质大分子电镜制样技术	(85)
3.4.3	多糖大分子电镜制样技术	(86)
§ 3.5	电子显微镜细胞化学技术	(87)
3.5.1	基本原理	(87)
3.5.2	三磷酸腺苷酶(ATPase)	(88)
3.5.3	酸性磷酸酶(ACP)	(89)
3.5.4	碱性磷酸酶(ALP)	(90)
3.5.5	琥珀酸脱氢酶(SDH)	(91)
3.5.6	葡萄糖-6-磷酸酶	(93)
3.5.7	髓过氧化物酶	(94)
§ 3.6	电镜放射自显影技术	(95)
3.6.1	原理	(95)
3.6.2	材料与仪器设备	(97)
3.6.3	实验步骤	(97)
§ 3.7	冷冻复型技术	(101)
3.7.1	原理	(101)
3.7.2	仪器设备及药品	(102)
3.7.3	实验步骤	(103)
3.7.4	冷冻蚀刻复型图像的辨认	(106)
§ 3.8	免疫电镜胶体金标记法	(107)
3.8.1	基本原理	(107)
3.8.2	实验程序	(108)
3.8.3	电镜水平的免疫染色	(111)
§ 3.9	核酸分子杂交技术	(115)
3.9.1	基本原理	(115)
3.9.2	试剂和器具	(116)
3.9.3	rDNA 探针的制备和标记	(116)
3.9.4	原位杂交及杂交子的检测	(118)
§ 3.10	扫描电镜样品制备技术	(119)
3.10.1	基本原理	(119)
3.10.2	扫描电镜的活体样品制备	(120)
3.10.3	孢子、花粉等少水样品的制备	(121)
3.10.4	扫描电镜一般生物样品制备方法—— ODO-导电染色法	(121)
	思考题	(123)
	参考文献	(123)
	附录1 仪器操作步骤	(124)
	附录2 缓冲液	(125)
	附录3 固定液	(127)
	附录4 其它	(129)

第四章 超离心技术	(130)
§ 4.1 基本原理	(130)
4.1.1 离心力	(130)
4.1.2 沉降系数	(131)
4.1.3 沉降时间	(133)
4.1.4 沉降速度	(134)
§ 4.2 离心机的种类和基本结构	(134)
4.2.1 高速离心机	(134)
4.2.2 制备性超速离心机	(135)
4.2.3 分析性超速离心机	(136)
§ 4.3 超离心法	(137)
4.3.1 差速离心法	(137)
4.3.2 密度梯度离心法	(137)
4.3.3 等密度梯度离心法	(139)
4.3.4 密度梯度的制备和收集	(139)
§ 4.4 超速离心在生物学中的应用	(142)
4.4.1 分子量的测定	(142)
4.4.2 未知 DNA 样品密度的测定	(142)
4.4.3 从密度推算 DNA 的 G-C 碱基含量	(143)
4.4.4 检测生物大分子中构象的变化	(143)
§ 4.5 实验	(144)
4.5.1 大鼠肝线粒体的分离	(144)
4.5.2 大鼠肝细胞核的分离	(145)
4.5.3 氯化钠密度梯度纯化质粒 DNA	(146)
4.5.4 氯化铯等密度梯度超离心纯化质粒 DNA	(147)
思考题.....	(150)
参考文献.....	(151)
附录 1 离心机的操作规程	(151)
附录 2 DGF-U 型密度梯度形成仪操作规程	(153)
附录 3 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算	(153)
第五章 紫外-可见分光光度法	(155)
§ 5.1 基本知识	(155)
5.1.1 紫外-可见光吸收光谱的本质	(155)
5.1.2 Lambert-Beer 定律	(156)
5.1.3 吸收定律的正确应用	(157)
§ 5.2 分光光度计的一般结构	(160)
§ 5.3 紫外-可见分光光度计的特殊装置	(162)
5.3.1 扫描装置的设计原理	(162)
5.3.2 斩波器	(163)
5.3.3 双光束分光光度计的光路设计	(163)

5.3.4	双波长分光光度计的光路设计	(163)
§ 5.4	分光光度法	(164)
5.4.1	定性分析	(164)
5.4.2	定量分析	(165)
§ 5.5	生物大分子的光学特性	(167)
5.5.1	蛋白质的光学特性	(167)
5.5.2	核酸的光学特性	(168)
§ 5.6	实验	(168)
5.6.1	单色器的分光效应	(168)
5.6.2	高锰酸钾的可见光谱	(169)
5.6.3	蛋白质和 DNA 的紫外吸收光谱	(170)
5.6.4	蛋白质的微分光谱	(170)
5.6.5	苹果酸脱氢酶(MDH)的测定	(172)
5.6.6	不同组织苹果酸脱氢酶 k_m 值的测定	(173)
5.6.7	心肌、骨骼肌线粒体内膜 ATPase 的测定	(174)
5.6.8	DNA 的 T_m 值测定	(174)
5.6.9	DNA 中 A-T 碱基含量的紫外分析法	(175)
5.6.10	烟酸的光谱测定	(176)
5.6.11	豆类球蛋白的定量分析	(178)
5.6.12	豆类醇溶蛋白的定量分析	(179)
5.6.13	维生素 D 的测定	(180)
5.6.14	豆类种子 β -胡萝卜素的测定	(182)
	思考题	(184)
	参考文献	(184)
第六章	红外分光光度法	(185)
§ 6.1	基本知识	(185)
6.1.1	分子的主要振动类型——伸展振动和弯曲振动	(185)
6.1.2	吸收带的位置和强度	(186)
6.1.3	吸收峰的代表方法	(187)
6.1.4	几种常用术语	(187)
§ 6.2	基本结构	(187)
6.2.1	干涉仪原理	(188)
6.2.2	付里叶转换	(189)
§ 6.3	红外光谱分析的试样制备方法	(190)
§ 6.4	实验	(191)
6.4.1	试样制备技术	(191)
6.4.2	蛋白质的红外光谱分析	(192)
6.4.3	多糖分子的红外光谱分析	(193)
6.4.4	脂溶性维生素的红外光谱分析	(194)
6.4.5	毛纤维的红外光谱分析	(194)

6.4.6 红外光谱法在基因探测中的应用	(195)
思考题	(196)
参考文献	(196)
附录 5DX 付里叶转换红外分光光度计	(197)
第七章 荧光分光光度法	(201)
§ 7.1 荧光分析的基本知识	(201)
7.1.1 荧光的产生	(201)
7.1.2 荧光量子产率	(201)
7.1.3 荧光强度	(202)
7.1.4 荧光偏振	(202)
7.1.5 相对荧光量子效率	(202)
§ 7.2 荧光分光光度计的基本结构	(204)
§ 7.3 荧光分析的影响因素及注意事项	(204)
7.3.1 温度对荧光的影响	(204)
7.3.2 pH 的影响	(204)
7.3.3 溶剂的影响	(204)
7.3.4 荧光的消退	(204)
7.3.5 防止污染	(204)
§ 7.4 生物样品的荧光分析	(204)
7.4.1 维生素 B ₁ 的测定	(206)
7.4.2 维生素 B ₂ 的测定	(208)
7.4.3 维生素 C 的测定	(209)
7.4.4 维生素 E 的测定	(211)
7.4.5 微量元素硒的测定	(213)
7.4.6 蛋白质的测定	(215)
7.4.7 肌肉中乳酸脱氢酶的测定	(216)
7.4.8 毫微克 DNA 的测定	(217)
7.4.9 单个细胞核 DNA 的测定	(218)
7.4.10 线粒体质膜流动性的测定	(218)
思考题	(219)
参考文献	(220)
附录 RF-540 荧光分光光度计的性能和操作方法	(220)
第八章 原子吸收光谱分析技术	(221)
§ 8.1 基本原理	(221)
8.1.1 原子吸收光谱的产生	(221)
8.1.2 原子谱线的轮廓与变宽	(222)
8.1.3 吸收定律	(224)
§ 8.2 仪器结构	(225)
8.2.1 光源	(226)
8.2.2 原子化器	(226)

8.2.3	单色器	(227)
8.2.4	检测器和读出系统	(227)
§ 8.3	分析方法	(228)
8.3.1	原子吸收光谱分析中的干扰及其消除	(228)
8.3.2	分析方法	(230)
8.3.3	灵敏度和检出限	(232)
§ 8.4	实验	(233)
8.4.1	苹果中钙含量的测定	(233)
8.4.2	血清中镁含量的测定	(234)
8.4.3	头发中铅含量的测定	(235)
8.4.4	食用豆中微量元素铁、锰、锌含量的测定	(236)
8.4.5	食用豆中微量元素铜、镍含量的测定	(237)
	思考题	(238)
	参考文献	(239)
	附录 1 塞曼原子吸收法的主要吸收线和原子吸收相对灵敏度	(239)
	附录 2 日立 180-80 型偏振塞曼原子吸收分光光度计操作规程	(241)
第九章	扫描显微分光光度法	(246)
§ 9.1	显微分光光度法测定原理	(246)
§ 9.2	显微光度计扫描测定的基本原理	(247)
§ 9.3	扫描显微分光光度计的基本结构	(247)
9.3.1	显微镜	(248)
9.3.2	光度计	(248)
9.3.3	扫描系统	(249)
9.3.4	自动控制系统	(249)
§ 9.4	显微光度法的应用实例	(250)
9.4.1	细胞容积的测定	(250)
9.4.2	剧烈运动前后细胞内酶的显微定量分析	(251)
9.4.3	染色体的核型分析	(253)
9.4.4	人染色体脆性位点的测定	(254)
9.4.5	染色体带纹的定量分析	(256)
9.4.6	核 DNA 的显微荧光定量分析	(261)
9.4.7	鱼三倍体 DNA 孚尔根测定方法	(262)
9.4.8	染色体 DNA 的显微荧光定量分析	(263)
9.4.9	毛纤维的荧光测定	(264)
	思考题	(264)
	参考文献	(265)
	附录 Univar 扫描显微分光光度计的性能及操作方法	(265)
第十章	气相色谱技术	(267)
§ 10.1	基本原理	(267)
10.1.1	概述	(267)

10.1.2	气相色谱的分析过程	(268)
§ 10.2	气相色谱仪的基本结构	(269)
10.2.1	气相色谱填充柱	(269)
10.2.2	毛细管色谱柱	(271)
10.2.3	检测器	(272)
§ 10.3	气相色谱分析方法	(274)
10.3.1	操作条件的选择	(274)
10.3.2	定性和定量方法	(275)
§ 10.4	实验	(277)
10.4.1	食用豆类脂肪酸的气相色谱分离和测定	(277)
10.4.2	植物激素脱落酸的毛细管色谱分离和测定	(279)
10.4.3	微生物胞外多糖的毛细管色谱分离和测定	(281)
10.4.4	玉米螟昆虫激素的气相色谱分离和测定	(282)
10.4.5	酒精发酵液中乙醇含量的气相色谱分析	(283)
10.4.6	食用豆类碘的测定	(284)
10.4.7	丁醇的气相色谱分析	(286)
10.4.8	植物材料释放乙烯的气相色谱分离和测定	(288)
	思考题	(289)
	参考文献	(289)
附录 1	岛津 GC-7A 气相色谱仪的操作方法	(289)
附录 2	实验室常用固定液	(293)
附录 3	不同温度下水的饱和蒸气压	(294)
附录 4	不同进出口压力时的压力校正值 j	(294)
附录 5	标准筛的规格	(295)
第十一章	高效液相色谱分离分析技术	(296)
§ 11.1	概述	(296)
§ 11.2	HPLC 的类型及其分离的基本原理	(296)
11.2.1	液-固色谱	(296)
11.2.2	液-液色谱和键合相色谱	(297)
11.2.3	离子交换色谱	(298)
11.2.4	排斥色谱(凝胶色谱)	(298)
§ 11.3	高效液相色谱仪的结构	(299)
11.3.1	储液瓶	(299)
11.3.2	高压输液泵	(300)
11.3.3	进样系统	(300)
11.3.4	色谱柱	(301)
11.3.5	检测器	(301)
§ 11.4	实验	(302)
11.4.1	单核苷酸的分离分析	(302)
11.4.2	可溶性糖的定量分析	(303)

11.4.3	氨基酸的分离分析技术	(304)
	思考题	(306)
	参考文献	(307)
附录 1	岛津 LC-4A 高效液相色谱仪的结构与操作	(307)
附录 2	氨基酸分析的预处理技术	(310)
第十二章	薄层色谱扫描仪	(317)
§ 12.1	仪器结构原理	(317)
12.1.1	测定原理	(317)
12.1.2	仪器结构	(318)
§ 12.2	扫描方法	(321)
§ 12.3	实验	(322)
12.3.1	线性扫描操作技术	(322)
12.3.2	锯齿扫描操作技术	(322)
12.3.3	微量核酸样品的定量分析	(323)
12.3.4	同功酶的定量分析	(323)
	思考题	(324)
	参考文献	(325)
附录 1	CS-910 双波长薄层色谱扫描仪的性能与操作	(325)
附录 2	C-RIB 的定量分析方法	(327)
第十三章	等电聚焦凝胶电泳技术	(329)
§ 13.1	基本原理	(329)
§ 13.2	仪器结构	(331)
13.2.1	平床电泳仪	(331)
13.2.2	与平床电泳仪配套的装置	(331)
§ 13.3	聚丙烯酰胺(PAA)凝胶	(332)
13.3.1	聚丙烯酰胺凝胶的结构和聚合	(332)
13.3.2	聚丙烯酰胺凝胶浓度和交联度	(333)
13.3.3	聚丙烯酰胺凝胶的制备	(334)
13.3.4	凝胶板的制备	(335)
13.3.5	凝胶板的放置	(335)
13.3.6	电泳操作	(335)
13.3.7	预聚焦	(336)
13.3.8	加样	(336)
13.3.9	电泳	(337)
13.3.10	固定与染色	(337)
§ 13.4	实验	(338)
	思考题	(340)
	参考文献	(340)
附录	多用电泳仪的结构和操作要点	(340)

第十四章 交变脉冲电场凝胶电泳	(346)
§ 14.1 原理.....	(346)
§ 14.2 交变脉冲电泳装置的类型.....	(346)
14.2.1 正交交变电场凝胶电泳.....	(346)
14.2.2 箱形均匀电场电泳.....	(347)
14.2.3 旋转凝胶电泳.....	(348)
14.2.4 倒转电场凝胶电泳.....	(348)
§ 14.3 影响 PFGE 分离的因素	(348)
14.3.1 脉冲时间的影响.....	(348)
14.3.2 分子大小、电场强度和温度的影响	(348)
14.3.3 电场间角度的影响.....	(349)
§ 14.4 分子陷阱.....	(349)
§ 14.5 分子泳动的机制.....	(350)
14.5.1 常规电泳的分子机制.....	(350)
14.5.2 FIGE 分离过程的分子机制	(350)
14.5.3 分子在 OFAGE 中的重新定向机制	(350)
14.5.4 巨大分子的泳动.....	(351)
§ 14.6 带宽和分辨率.....	(352)
§ 14.7 脉冲电泳方法.....	(352)
14.7.1 样品制备.....	(352)
14.7.2 DNA 的标准品	(352)
14.7.3 电泳方法.....	(353)
§ 14.8 应用实例.....	(353)
14.8.1 酵母染色体 OFAGE 的分离	(353)
14.8.2 棉病囊霉的电泳核型分析.....	(354)
14.8.3 小麦、大麦、黑麦大分子量 DNA 的脉冲电泳分离	(355)
14.8.4 水稻大分子 DNA 的脉冲电泳分离	(355)
参考文献.....	(356)

第一章 研究用显微镜技术

显微镜的发明,距今虽有四百余年,但仍然是研究生命科学的重要工具。光学显微镜在这四百年中,不断改进创新,适应生命科学发展的需要,出现了各种功能的显微镜,是进行细胞生物学研究必须掌握的工具。

§ 1.1 研究用显微镜的结构原理

显微镜结构分光学、照明、机械三个系统。决定质量好坏的是光学系统,光学系统包括目镜、物镜和聚光器。样品通过物镜形成初生倒置实象,然后通过目镜在人的眼球视网膜上形成直立实象,此象经过线反向延长,在显微镜中一定距离处形成倒置虚象,虚象和视网膜上的实象完全重合,如图 1-1 所示。

在显微镜的结构中,几个常用术语含意如下:

(1) 明视距离

从眼睛的水晶体到放大的虚象的距离为 250mm。

(2) 机械筒长

镜筒管上缘到物镜螺旋肩基部的长度,一般为 160mm,如图 1-2 所示。

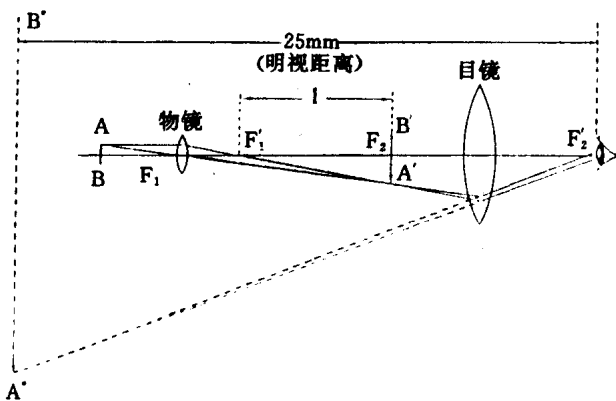


图 1-1 光学显微镜成像图

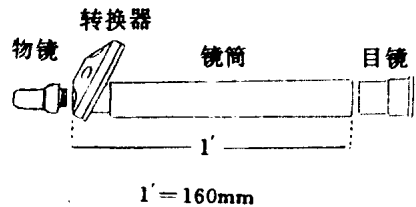


图 1-2 机械筒长

(3) 光学筒长

由物镜的上焦平面到目镜的下焦平面之间的距离(图 1-1 中的 l)。其长度随机械筒长及物镜而不同,光学筒长略小于机械筒长。仪器上所注数字一般是指机械筒长。

1107459

§ 1.2 研究用显微镜的光学系统

1.2.1 显微镜的基本光学参数

1. 分辨力(Resolving Power)

分辨力也叫分辨本领或解象力,光学显微镜分辨力定义为在 25cm 明视距离处能分辨清楚尽可能靠近的两点的能力,辨认两点之间的距离愈小,则分辨本领愈高,人眼的分辨力约为 $100\mu\text{m}$,而显微镜的分辨力 R 则以下列公式计算:

$$R = 0.61\lambda / N.A.$$

式中, λ —— 所用的光线波长

$N.A.$ —— 数值孔径

从上述公式可以看到,决定显微镜的分辨力主要有两个因素,一是数值孔径,一是波长。数值孔径愈大,波长愈短,能分辨清两点距离愈小,显微镜的分辨力愈高。

数值孔径(Numerical Aperture, $N.A.$)也称镜口率,由两个参数组成,即:

$$N.A. = n \cdot \sin a$$

式中, n —— 物空间介质的折射率

a —— 物方孔径角

图 1-3 为数值孔径图解。

孔径角亦称镜口率,是从物方光轴上的物点发出的光线,与物镜前透镜有效直径的边缘所张开的角度, a 是轴上点光线在干燥系统的孔径角, b 是油浸系统的孔径角, a 和 b 值小于 90° , $\sin a$ 和 $\sin b$ 最大值不超过 1,油浸物镜由于 n 值变大, $N.A.$ 值也随之变大,目前最多可达 1.4。而照明波长最短为 400nm ,代入公式则 $R = 0.61 \times 0.4 / 1.4 = 0.17$,即光学显微镜最大分辨力约为 $0.2\mu\text{m}$,约等于可见光最短波长的一半。细胞内的结构如线粒体、中心体、核仁等在这种分辨力水平观察到的结构,称为显微结构。

2. 放大率(Magnification)

放大率也称放大倍数,是眼睛看到象的大小与对应标本大小的比值,放大倍数是指长度而不是指面积与体积。

$$\text{目镜放大倍数 } MF_{\text{目}} = \frac{250\text{mm}(\text{明视距离})}{f'_{\text{目}}(\text{目镜焦距})}$$

$$\text{物镜放大倍数 } MF_{\text{物}} = \frac{160\text{mm}(\text{光学筒长})}{f'_{\text{物}}(\text{物镜焦距})}$$

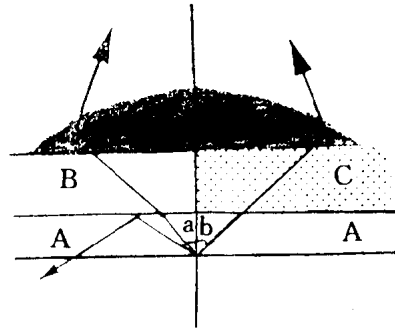


图 1-3 数值孔径图解

A—玻璃盖片;B—空气($n=1$);

C—油($n=1.5$);D—物镜

$$\text{显微镜总放大倍数 } MF_{\text{总}} = \frac{Al}{f'_{\text{物}}} \cdot \frac{250}{f'_{\text{目}}}$$

目镜的焦距不能太短,因为人眼瞳孔要与出射光孔重合,一般在 10mm 以上,放大率不高,即 $\frac{250}{10} \approx 25$,光学筒长(l)也不能无限延长,只有靠减小 $f'_{\text{物}}$ 来提高放大率。

3. 焦点深度(Depth of Focus)

在视野中垂直范围内能观察到的界限称为焦点深度,也就是调焦看清楚标本的某一物点时,不仅这一点看清楚,此点的上下两侧也能看清楚,能看清楚的厚度叫焦点深度,焦点深度 d 可用下式表示:

$$d = \frac{kn}{M N \cdot A}$$

k 为常数约 0.24mm, M 是总放大倍数, n 为介质折射率。 d 与 $M \cdot N \cdot A$ 成反比,即放大倍数愈高,数值孔径愈大,而焦点深度愈浅。

4. 工作距离(Working Distance, W. D.)

$W. D.$ 是从物镜的第一个镜片表面到盖玻片表面或标本表面之间的距离。数值孔径越大,而工作距离愈小,物方孔径角就愈大,在物镜孔径一定条件下,一般干燥系统的 $N \cdot A$ 为 0.40 时, $W. D.$ 为 0.5mm,而 $N \cdot A$ 达到 1.40 时, $W. D.$ 只有 0.10mm。

5. 图象亮度和清晰度

亮度是指象的亮暗程度,这对于显微镜照像和投影关系极大,从光学参量研究图象亮度为:

$$I = \frac{[N \cdot A]^2}{[M]^2}$$

即象的亮度与数值孔径的平方成正比,与显微镜总放大倍数的平方成反比。在自然条件下,放大倍数愈高,镜象亮度愈暗。现代研究用显微镜,一般多用钨灯光源,调节电压,与自然光相比光线均匀,亮度稳定,提高入射光强度以解决高倍观察时的亮度问题。

清晰度是指显微镜形成物象明显程度的能力。清晰度除仪器性能外,主要在于盖玻片的质量和厚度,一定要根据物镜上的要求,正确使用盖玻片。

1.2.2 光学透镜的象差

象差(Aberration)是指白色光线通过透镜后得不到一个白色的清晰象点,象差有 6 种,是影响显微镜性能的主要问题。

1. 色差(Chromatic Aberration)

由于白色光线通过透镜后,分解成各种波长的光,因焦距不同,各自形成象点,在不同象平面观察都有颜色,使象变得模糊不清。

2. 球面象差(Spherical Aberration)

由于玻璃透镜表面呈球状,边缘与中间厚薄不一,单色光通过时边缘与中间焦点不同,不