

高等学校教材

细胞生物学实验

(第二版)

杨汉民 主编

高等教育出版社

高等学校教材

细胞生物学实验

(第二版)

主 编 杨汉民

副主编 刘玉章

编 委

王子淑 刘玉章 连慕兰

杨汉民 高伟良 徐宗尧

高等教育出版社

(京)112号

内 容 提 要

本书为高等学校细胞生物学实验教学用书。内容涉及细胞膜的特性,细胞器的分离,细胞骨架成分的观察,细胞成分的化学测定,染色体标本的制备与分析,放射性同位素在细胞生物学中的应用,细胞生理,细胞免疫,细胞电泳,细胞培养,细胞融合,细胞的遗传转化,显微镜,显微摄影及电镜技术等方面共54个实验。全书分为两部分,前26个实验为小实验性质,主要用于各类院校生物学基础课程细胞生物学实验之用。后28个实验为大实验性质,专门用于细胞生物学专业课程及相关专业硕士生的专业技术训练。本书除了用于实验教学之外,还可供有关科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验/杨汉民主编. -2版. -北京:高等教育出版社,1997.8

ISBN 7-04-006011-6

I. 细… I. 杨… III. 细胞学:生物学-实验-高等学校-教材 N. Q28-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 02261 号

*

高等教育出版社出版

北京沙滩后街55号

邮政编码:100009 传真:64014048 电话:64054588

新华书店总店北京发行所发行

高等教育出版社印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 16.5 字数 440 000

1997年7月第1版 1997年7月第1次印刷

印数 0 001-5 105

定价 13.50 元

凡购买高等教育出版社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题者,请与当地图书销售部门联系调换

版权所有,不得翻印

第二版前言

80年代中期,全国高等院校的细胞生物学教学工作有了较大的发展。综合大学和师范院校已把细胞生物学作为主干基础课列入教学计划之中,多数医科院校和农、林院校也把该课作为必修课或选修课而普遍开设。为了提高教学水平,巩固教学效果,各校在进行课堂理论教学的同时,还尽力创造条件,及时开设了实验课。设置细胞生物学专业的学校还开设了大实验课。

近几年来,随着学科本身的飞速发展,理论教学内容有了较大的更新。实验教学中也出现了一批更具先进性和实用性的新内容。为了及时汇集国内实验教学中的新方法,反映国内实验教学的新水平,促进全国高等院校细胞生物学实验教学整体水平的提高,我们受高等教育出版社的委托,再次邀请综合大学、师范院校、医科院校及农、林院校共13所高等院校的26位任课教师对原编写的《细胞生物学实验》(兰州大学主编,高等教育出版社,1986年8月第1版)进行修订和补充。

参加修订本书的单位和个人有:北京大学李荫蓁(实验二十)、高伟良(实验二十四、三十九);南开大学宁文芹(实验四十六);山东大学韩贻仁(实验四十九)、刘玉章(实验二十三、二十五、三十一、四十三)、樊廷俊(实验九、四十七);四川大学王子淑(实验十五、十七、十九、三十四、四十三、四十五)、王晓飞(实验三十五);武汉大学余其兴(实验十四);暨南大学汪引萱(实验五);兰州大学贾敬芬(实验二十二、五十一、五十三)、杨汉民(实验十三、十六、十八)、聂秀苑(实验二十七、二十九)、高金城(实验四、二十八)、高清祥(实验二十一)、王新宇(实验五十四)、郑海金(实验三十六、三十七、三十八)、吴应文(实验三十三)、王晓萱(实验四十一、四十二)、詹玉田(实验二十六、三十三);北京师范大学王永潮(实验四十八)、连慕兰(实验十、十一、十二、三十);华东师大王耀发(实验四十);上海第二军医大学王肖鹏(实验七、八);北京农业大学刘瑞凝(实验五十、五十二);浙江农业大学王以秀(实验六)。上述单位和个人,大多具有较长的教学经历和丰富的教学经验以及科学研究中某些方面的长期积累。因此,所编的内容充分体现了各自的优势和特色,反映了国内实验教学的新水平,具有明显的科学性、先进性和实用性。

本书供综合大学、师范院校、医科院校及农、林院校细胞生物学实验教学之用。由于各个学校的教学要求和具体条件有所差别,因此没有统一列出必作和选作的实验目录。使用本教材时,各校可以根据具体条件自由选择,灵活掌握。

虽然编者为本书的修订和再版作了很大努力,但因业务水平和工作经验所限,书中难免还存在缺点和不足。为此深切盼望广大师生在使用本教材的过程中能够提出批评和建议,以备再版时修改。

编 者

1993年10月于兰州大学

第一版前言

1984年7月,在兰州大学举办了全国高等院校细胞生物学实验讲习班。北京大学、山东大学、四川大学、兰州大学、北京师范大学、华东师范大学及东北师范大学共7所高等院校,为讲习班提供了实验教材并负责实验讲授、指导工作。在讲习班结束的总结会上,讲习班的同志一致认为这次讲习班所采用的实验内容新颖,水平较高,积累了各校的经验,体现了各校的特色,对于更新现有实验内容,提高实验水平,会有很大促进作用,因此建议汇编出版。为了满足这一迫切要求,我们从讲习班上各校交流的实验教材中选择了部分内容,与本次讲习班所用教材合在一起,汇编成本教材,供高等院校细胞生物学实验使用。考虑到各校的实际情况和不同要求,书中实验项目比较广泛,既有设备简单、方法简便的基本实验,又有要求较高、用途较广的实验。在使用本书时,各校可自行选择,灵活安排。

本书是在中国细胞生物学学会教学专业组组长、兰州大学细胞生物学研究室主任郑国锷教授的热情关怀和具体指导下,由兰州大学杨汉民同志负责汇编而成。下列同志为本书编写了部分实验:北京大学李荫蓁(实验十八)、高伟良(实验二十八);山东大学韩贻仁(实验二十一)、刘玉章(实验十九、二十六);四川大学王子淑(实验十二);兰州大学贾敬芬(实验二十三、二十四)、王义琛(实验二十五、二十七、三十七)、聂秀苑(实验三十六)、高清祥(实验十三、二十二)、刘力生(实验三十、三十一);南开大学(实验十四);武汉大学余其兴(实验八、十五);中山大学陈婉萌(实验十七);暨南大学汪引宣(实验十六);北京师范大学王永潮(实验二十)、连慕兰(实验六、九);东北师范大学徐宗尧(实验三十二、三十三);华东师范大学黄祥辉(实验十、十一)、王耀发(实验二十九);福建师范大学傅荣典(实验七);辽宁师范学院卞小庄(实验一、二、三);北京农业大学敖明光(实验三十四、三十五);浙江农业大学王以秀(实验四、五)。在组织编写本书的过程中,还有许多同志为本书提供了宝贵的意见和建议。编者在此对以上同志表示衷心的感谢。由于篇幅的限制,许多院校具有特色的实验内容未能编入,这是非常遗憾的,有待以后修改,不断充实。

限于我们的水平和经验,书中错误和不妥之处在所难免,热忱地希望同志们批评指正。

编 者

1985年10月于兰州大学

目 录

实验一	普通光学显微镜及其使用	(1)
实验二	特殊显微镜及其使用	(11)
	Ⅰ. 暗视场显微镜	(11)
	Ⅱ. 相差显微镜	(15)
	Ⅲ. 荧光显微镜	(21)
实验三	显微摄影术	(26)
实验四	电子显微镜的演示	(49)
实验五	细胞凝集反应	(53)
实验六	细胞膜的渗透性	(54)
实验七	巨噬细胞吞噬现象的观察	(56)
实验八	线粒体和液泡系的超活染色与观察	(58)
实验九	叶绿体的分离与荧光观察	(61)
实验十	线粒体的分离与观察	(63)
	Ⅰ. 大鼠肝线粒体的分离	(64)
	Ⅱ. 玉米线粒体的分离	(65)
实验十一	动物细胞微丝束的光学显微镜观察	(66)
实验十二	微管和中等纤维的免疫荧光观察	(69)
	Ⅰ. 动物细胞微管的观察	(69)
	Ⅱ. 动物细胞中等纤维的观察	(71)
	Ⅲ. 植物细胞微管的观察	(73)
实验十三	DNA 的 Feulgen 染色法	(75)
实验十四	酸性磷酸酶的显示方法	(77)
实验十五	动物染色体标本的制备与观察	(79)
	Ⅰ. 小白鼠骨髓细胞染色体的制备方法	(80)
	Ⅱ. 黑斑蛙或蟾蜍骨髓细胞染色体标本的制备	(81)
实验十六	植物染色体标本的制备与观察	(82)
实验十七	染色体核仁组成区的银染色法	(83)
实验十八	减数分裂压片标本制备与观察	(85)
实验十九	联会复合体的染色与观察	(87)
实验二十	动物细胞培养	(89)
	Ⅰ. 原代细胞培养	(89)
	Ⅱ. 传代细胞培养与观察	(92)
实验二十一	植物组织培养	(97)
实验二十二	植物原生质体的分离和培养	(101)
实验二十三	细胞电融合方法	(105)
实验二十四	显微放射自显影技术	(111)
实验二十五	细胞电泳	(116)

实验二十六	类坏死的处理及死、活细胞鉴别	(122)
实验二十七	透射电镜样品的制备与观察	(124)
	I. 组织的固定和包埋	(124)
	II. 支持膜的制作	(126)
	III. 玻璃刀的制作	(127)
	IV. 包埋块的修正	(130)
	V. 切片	(130)
	VI. 切片的染色	(131)
	VII. 透射电镜样品的观察	(132)
实验二十八	扫描电镜样品的制备与观察	(133)
实验二十九	电镜酶化学技术	(141)
	I. 三磷酸腺苷酶	(141)
	II. 酸性磷酸酶	(142)
实验三十	细胞器的分离	(143)
实验三十一	膜蛋白质的分离	(149)
实验三十二	脂质体的制备	(156)
实验三十三	荧光标记技术	(158)
实验三十四	免疫胶体金技术	(161)
实验三十五	MAT 法检测化学药物对体外培养细胞增殖及存活的影响	(164)
实验三十六	腹腔巨噬细胞吞噬功能检测方法	(166)
实验三十七	改良的空斑形成细胞测定法	(168)
实验三十八	T 淋巴细胞玫瑰花结实验	(171)
实验三十九	^3H 标记化合物研究细胞内 DNA 和 RNA 的合成	(173)
实验四十	^3H 标记膜片法测定细胞 S 期的 DNA 复制	(185)
实验四十一	用 ^3H 标记化合物研究细胞内 DNA、RNA 和蛋白质代谢的动态过程	(186)
实验四十二	用 ^{32}P -磷酸氢二钠研究细胞内 ATP 代谢的动态过程	(189)
实验四十三	放射免疫测定法	(191)
实验四十四	人体染色体组型分析与分带技术	(195)
	I. 微量全血培养	(195)
	II. 人淋巴细胞染色体标本的制作	(196)
	III. 人类体细胞染色体组型分析	(199)
	IV. 人类染色体 G 带显示法	(201)
实验四十五	人体姊妹染色单体区分染色法	(203)
实验四十六	植物染色体组型分析与分带技术	(205)
	I. 植物染色体标本制备的去壁低渗法	(205)
	II. 植物染色体组型分析方法	(208)
	III. 植物染色体 Giemsa C-带技术	(211)
	IV. 植物染色体 Giemsa N-带技术	(213)
	V. 植物染色体 Giemsa G-带技术	(214)
实验四十七	杂交瘤技术	(216)

实验四十八	哺乳类细胞中早熟染色体凝集的诱导和观察·····	(223)
实验四十九	哺乳动物早期胚胎细胞的活体观察及体外培养技术·····	(226)
实验五十	植物细胞的悬浮培养·····	(235)
实验五十一	植物原生质体融合与体细胞杂交·····	(237)
	I. 聚乙二醇法诱导原生质体融合 ·····	(237)
	II. 供体-受体原生质体融合与胞质杂种的形成 ·····	(239)
实验五十二	质粒 DNA 的快速提取 ·····	(241)
实验五十三	用根癌农杆菌介导植物细胞的遗传转化·····	(245)
实验五十四	植物细胞免疫荧光原位杂交·····	(248)

实验一 普通光学显微镜及其使用

实 验 目 的

了解普通光学显微镜的构造及其原理,并熟练掌握其操作方法。

实 验 用 品

普通复式光学显微镜、载玻片、盖玻片、香柏油、生物制片标本、滤纸、擦镜纸。

实验原理和方法

普通光学显微镜从构造上可分光学、机械和电子三大系统。现仅重点阐述其光学系统及显微镜的操作技术。

一、显微镜的光学系统

光学系统通常由物镜、目镜、聚光器和光阑组成。

(一)物镜(objective)

显微镜的质量主要取决于物镜。物镜种类繁多,性能相差悬殊,制造厂家不一。同类物镜因工艺水平的高低,性能迥异。

1. 物镜的种类

根据像差的校正程度,物镜可分为下列数种:

(1)消色差物镜(achromatic objective)

消色差物镜,制造容易,是最常见的物镜,金属外壳上不刻代表标志。该物镜将光谱中红光和蓝光聚焦于一点,黄绿光则聚焦于另一点,并纠正了黄绿光的球差。其最佳清晰范围是 $510\sim 630\text{nm}$ 之间。

(2)复消色差物镜(apochromatic objective)

复消色差物镜是用特殊的光学玻璃制成,纠正了可见光的红、绿、蓝三种色光的色差,使之聚焦于一点,质量优良。最佳清晰范围是 $400\sim 720\text{nm}$,容纳了全部可见光谱。残留有像场弯曲,使平面物体形成类似球形弯曲面的影像。结果使视野中心和边缘的影像不能同时准焦。复消色差物镜的金属外壳,刻有“AFO”字样,供作识别。

(3)萤石物镜(fluorite objective)

亦称半复消色差物镜(semi-apochromatic objective)。构成物镜的光学透镜,全部或大部分由萤石透镜取代,故名萤石物镜。色差校正介于消色差物镜与复消色差物镜之间,故又可称半复消色差物镜。最佳清晰范围在波长 $430\sim 680\text{nm}$ 的光谱区,包括了绝大部分的可见光谱。物镜的金属外壳,刻有“FL”字样。(图 1-1 左)

上述三种物镜都残留程度不同的场曲,使得视场内不同部分的影像,不能同时准焦。镜检时,尽管可采用分区聚焦、渐次观察的方法,可是显微摄影却无法把分散于全视场的样品清晰地摄入一帧画面之中。

(4)平场物镜(plan objective)

平场物镜,除具有其它物镜的优点外,还校正了场曲。在相等的放大率下,所成影像要比一般物镜的影像为大。平场物镜有多种类别外壳上刻有不同的字样,以资区别:“PL”(平场消色差物镜)、“PL·FL”(平场萤石物镜)、“PLAN”(平场消色差物镜)和“PL·APO”(平场复消色差物镜)等,其中以“PL·APO”为最佳。(图 1-1 右)

各种类型的平场物镜,都要与精制的平场目镜配合使用。

物镜使用时,按前透镜与被检标本盖片之间的介质情况,又可分下列两类:

(1)干燥系(dry system)物镜

镜检时,物镜与盖片间,不添加任何液体。如 4×、10×、20×和 40×物镜都属于干燥系,使用时不加用任何浸液,只以空气为介质,其折射率为 1,所以干燥系物镜的数值孔径小,分辨率亦低。

(2)浸没系(immersion system)物镜

物镜在使用时,前透镜与盖片之间浸满液体。依充添的浸液的不同,主要可分为油浸系(oil immersion)和水浸系(water immersion)等类别。最常用的浸没液为香柏油(ceder oil),其折射率为 1.515,与玻片的折射率相近,且不易干涸。使用水浸物镜时加用水,其折射率 1.33。

油浸物镜外壳上刻有:“oil”、“oel”、“imm”和“HI”等字样,水浸物镜刻有“W”或“Water”字样;油、水浸两用物镜则刻上“oil+w”字样;(图 1-1 右);甘油浸没物镜刻有“Glyc”或“Glyz”等字样。

2. 物镜壳上的标志:

物镜的金属外壳上,刻有多种符号和数字分别代表物镜性能、规格、类别和使用条件等

(1)物镜的种类。

APO(复消色差物镜)、FL(萤石物镜或半复消色差物镜)、PL(平场物镜)、PL·FL(平场萤石物镜)和 PL·APO(平场复消色差物镜)。

(2)放大倍数

用数字表示,如 4、10、20、40 和 100 等。

(3)数值孔径

物镜的数值孔径(numerical aperture),通常简称为 N. A.,其值多用数字刻在物镜外壳上,如 0.25、0.65 和 1.3 等。常和放大倍数写在一起,如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.3 等。

(4)标准机械筒长

显微镜的机械筒长,当今主要有两种标准,即 160mm 和 170mm,用数字刻在镜壳上,如 160, 170。 ∞ 表示机械筒长为无限大,为某些特种显微镜的筒长。机械筒长是指从镜筒的目镜管上缘至物镜螺旋肩的距离,以 mm 表示。

(5)需用盖片情况

根据物镜的种类不同,镜检时在被检标本(或样品)上加或不加盖玻片。凡需加用盖玻片的物镜,在外壳上刻有需盖玻片的厚度(mm),如 0.17。刻值常与机械筒长写在一起如 160/0.17。

160/0 或 160/-:筒长 160mm,盖片厚度为 0,即不需加用盖玻片(绝对不用盖玻片!)

160/-:筒长 160mm,盖片有无皆可。

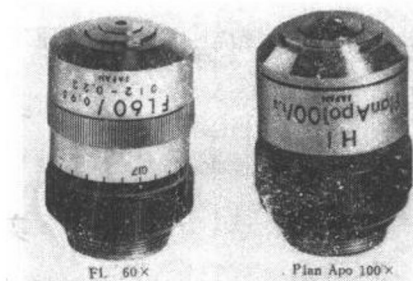


图 1-1 两种接物镜

左:萤石物镜 (FL)60/0.95

右:平场复消色差物镜 PLAN APO 100/1.3 HI

$\infty/0$ 或 $\infty/-$:筒长为无限大,盖玻片厚度为零或有无皆可。

(6)物镜与被检样品间的介质情况

干燥系物镜无符号。

油浸物镜:oil、oel 和 Hi 等,并在油镜末端刻一黑环,以示油浸。水浸物镜:W 或 Water 等。甘油浸物镜:Glyz 和 Glys 等

(二)目镜(eyepiece,ocular)

目镜作为影像和肉眼间的放大镜,将物镜映来的影像做第二次放大。同时,目镜作为物镜的补偿,把物镜残留下的像差给予进一步校正,以提高造像质量。目镜作为投影器,把放大的影像投射在摄影暗箱的焦平面上。

目镜通常由两片(组)正透镜组成,上面的透镜叫接目或眼透镜(eye-lens),它决定倍数和成像的优劣;下面的透镜叫会聚透镜(collective lens)或场镜(fieldpiece),它使视野边缘的成像光线向内折射,进入眼透镜中,使物体的影像均匀明亮。上下透镜的中点,或场镜下面设有用金属制造的光阑叫做视野光阑或场光阑(field stop)。场镜或物镜在这个光阑面造像,在光阑上可装入各种目镜测微计、十字线玻片和指针等。由眼透镜射出的成像光线基本上为平行光束,亦在目镜之上约 10mm 处交叉,此交叉点称作出射光瞳。

镜检观察,通过目镜所窥视的圆,即目镜光阑所围绕的范围,称作视场(field view)视场圆的直径叫做视场宽度,多用毫米表示。视场宽度与显微镜总放大率成反比,与物镜的放大率亦成反比。目镜的视场宽度依设计而不同,在同一放大率下,宽视场目镜视场最大,补偿目镜次之,惠更斯目镜最小。

目镜可分下列几种:

1. 惠更斯目镜(Huygeian eyepieces)

应用最广泛的目镜,眼透镜和场透镜皆由平凸单片透镜组成。凸面常朝下,两片透镜之间有一圆形光阑,场透镜把物镜射来的光线会聚于光阑处,眼透镜再把这一一年四季影像放大,以待观察。由于场透镜射来的是会聚光线,眼透镜可以远较场镜为小。目镜的放大率与眼透镜的直径和目镜的筒长相关,透镜直径愈小,筒长愈短,放大率愈大。此镜已逐渐淘汰。

2. 兰姆斯登目镜(Ramsden eyepieces)

亦由两片凸面相对的平凸透镜组成。眼透镜与场镜大小相仿。目镜光阑位于场镜下方,便于安放测微计与标线玻片。此镜在新型显微镜中已很少使用。

3. 补偿目镜(compensating eyepieces)

构造复杂,专为与复消色差物镜配合使用设计的。在目镜的设计上,补偿物镜残留的横向色差与之作到互补。眼透镜和场镜都用几片透镜粘合而成。因结构不同,焦平面位置有的在两组透镜之内,也有在两组透镜之外。补偿目镜常标有“compens”、“komp”和“c”、“k”等字样。

4. 平场目镜(plan eyepiece)

从结构上也是一类补偿目镜,平场目镜纠正了像场弯曲,视场平广,但补偿不了复消色差物镜的场曲,适于同平场物镜使用。平场目镜日趋增多。目镜的代表符号,因制造厂不同而别,如“PEN-PLAN”、“PLANOSCOPIC”、“PLAN”、“KPI”、“GF”和“GW”等。

5. 摄影目镜(photographic eyepiece)

专供显微摄影使用的一种目镜。其种类繁多,每厂家皆有各自的专用摄影目镜。有的目镜为一发散光线的负透镜系统,焦点和出射光瞳在同一方,都处于镜筒之中,有的目镜把被检样品的影像投射到距离较远的照相机机身的胶片面上。显微摄影时,物镜射出的成像光束经摄影目镜,将光线

发散出去,在胶片面上聚焦成像。

摄影目镜专司摄影,不能用作镜检观察。

当今世界各国不同厂家都相继推出各自的产品,常见的 OPTON(Leitz)、Nikon 和 OLYMPUS 系统显微镜,各具特有的物镜和目镜系统。设计独特,造型新颖,质量优良,种类繁多,风靡世界。

为提高显微镜的成像质量,各厂家在物镜和目镜的制造上,采取配套设计,互补配套,共同提高。在显微镜的使用上,只有采用同一工厂,相同系统的物镜和目镜配套使用,方能获得最佳光学效果。否则,定会招致成像质量的降低。为扩大显微镜视场,能在同一视场内看到更多的被检样品,现今广泛使用广视场(wide field)目镜和超广视场(super wide field 或 ultra wide field)目镜,以逐步取代普通视场目镜。

目镜的出射点或眼点(eyepoint)是成像光束射离目镜的聚焦点。镜检观察时,瞳孔必须与出射点重合方能窥见像。目镜出射点随目镜放大率的增加而降低,即靠近眼透镜,镜检时眼睛须贴近目镜。给予观察者带来诸多不便,尤其不适于众多的眼镜配戴者。由于镜片的阻截,瞳孔远离射点,看不到影像;摘脱眼镜,又因视力不佳难以进行观察。为此,近些年,各厂家相继制造出多规格的高出射点(high eyepoint)目镜。出射点高,即出射点与眼透镜的距离大。镜检者可随意戴上眼镜进行镜检。因之,目镜的出射点,已成为目镜的性能指标之一。

(三)聚光器(condensers)

聚光器等聚光系统,使来自光源的光线放大,并聚成光束,透过载片照明样品,射入物镜。聚光器由聚光镜和孔径光阑(aperture diaphragm)构成。聚光镜属正透镜系统,由一至数片透镜组成,具会聚作用,把照明光线会聚放大,射向被检样品,进入物镜。

孔径光阑位于聚光镜下方,光阑的孔径可变,以改变照明光束的直径,调节进光量。孔径光阑的开度,即聚光器数值孔径,左右显微镜的成像质量。物镜的有效数值孔径,其中涵容聚光器的数值孔径,即:

$$\text{物镜的有效数值孔径} = \frac{\text{物镜数值孔径} + \text{聚光器数值孔径}}{2}$$

聚光器数值孔径为 0.25~1.40 不等。使用数值孔径超过 1.0 的油浸物镜时,聚光器也应油浸,在聚光镜的上透镜与载玻片之间要充满浸油。

聚光器种类颇多,构造各异,光学质量差别甚大。由最低级的单片透镜构成的低孔径聚光器,到多片透镜组成的消色差/消球差聚光器(achromatic/aplanatic condenser)适于不同的物镜和用途,应妥善选用。

聚光器有不等的焦距,高倍物镜需用焦距较小的聚光器,低倍物镜需用焦距较大的聚光器。如用低倍物镜,没有与其相应的长焦距的聚光器时,可取下或旋出聚光器的上透镜,以提高焦距值,扩大视场。例如,一般的聚光器焦距可能为 1.2mm 左右,移开上透镜后,焦距可增至 5.5mm。

聚光器调中、准焦后,孔径光阑的开孔要适度。开度过小使聚光器和物镜的数值孔径下降,影响影像的分辨力,还可能产生光的衍射,降低成像质量。光孔过大,造成光线充溢,引起产生眩光,降低影像的清晰度和反差。聚光器孔径光阑的开孔的最大限度是等同于物镜的光孔,即以两者的数值孔径相等为度。

在镜检观察、显微摄影时,为提高影像的清晰度和反差,聚光器的孔径光阑不能开大,开度过大时,聚光器会出现球差和色差,因为透镜的边缘残存的像差较中心为大。

二、显微镜的照明

普通光学显微镜,普遍采用中心亮视野透射照明法。

(一)照明光源

照明光源以钨丝灯和卤钨灯为多。卤钨灯优于钨丝灯,为显微镜的主要光源。

1. 钨丝灯(tungsten lamp)

老式显微镜的主要光源。它不同于一般照明灯泡,具有灯泡体积小、电压低、钨丝团成点状和照明强度大等特点。常用电压 6~12V,功率 15~100W。灯丝小而集中,似点状,发出的光线易为聚光透镜集中成束而射入光路。光强随电压的升高而加大;光源的色温(colour temperature)亦随电压的增高而升高,色光为连续光谱。色温 3 200~3 400K 左右,红橙光多,蓝紫光较小,灯光略显黄色。钨丝灯寿命短,发光效率极低。

2. 卤钨灯(halogen lamp)

常见的多为溴钨灯,钨丝似点状,灯壳为石英玻璃。灯泡的体积很小,似一节小手指。一般为 12V,50~100W,色光为连续光谱,色温一般在 3 200~3 400K 左右,溴钨灯的灯壳不要直接触摸,以避免污染。点燃时,污染处易焦化。污染物可用酒精擦去。装卸灯泡时,要垫以塑料包装袋或薄纸。

(二)科勒照明(Kohler illumination)

1893 年德国杰出的学者 August Kohler 提出科勒照明法。其具体做法:在光源与聚光器之间,加放一光源聚光镜(lamp condenser)和视场光阑(field diaphragm),光源聚光镜把光线集成光锥,使光源灯成像于聚光器的孔径光阑平面处。同时,聚光器又使视场光阑成像在样品平面处。由此,充分地利用了照明光源,使点状的光源达到较大的照明,从而使样品得到均匀的照明,并防止了高温。这对显微摄影和镜检观察至关重要。

科勒照明法是当今最佳照明法,视场照明均匀,被摄物体不受热,影像清晰。新近的显微镜,照明系统已按科勒法设计装置,使用时稍加调整即达最佳照明状态。

视场的照明强度,用升降电压调节。

(三)光路及成像

显微镜的光路或光程(light path)即光源照明的通路。光路成像遵循科勒照明法。

光路始于光源灯,光源装在镜座后方的灯室(lamp housing)内。光源灯丝(S)发出的色光,由聚光透镜集光成束或光锥,经镜座中的视场光阑(L),投向反光镜,呈现 45°折射向上,入射孔径光阑,光源灯丝在此平面处第一次成像(S1)。透过聚光镜使光线放大、聚集,透射、照明载物台的样品,视场光阑在此平面处第一次成像(L1),即在样品聚焦的同时,可见清晰的、缩小的视场光阑的影像。成像光束继而进入物镜,在物镜的后焦面(rear focal plane)的平面处,光源灯丝第二次成像(S2)。成像光束经转折进入目镜,在目镜的场光阑平面处,视场光阑第二次成像(L2)。最终,成像光束从目镜眼透镜射出,在目镜的出射光瞳处,光源灯丝第三次成像(S3)。视场光阑的第三次成像(L3)在人眼的视网膜上。在成像系统中,一个位置的改变,会引起整个成像关系的改变,光源灯前后位置的稍许位移将导致光源成像位置的变动。

科勒照明法光路成像的关键,是光源的第一次像,聚焦在聚光器的孔径光阑平面上,视场光阑的第一次像,要聚焦在被检样品平面处。整个光路成像是共轭关系,互相制约,一动皆变。

三、显微镜的能力

显微镜的能力是质量和性能的标志。能力包括分辨率、放大率、焦点深度和视场宽度等,其中最重要的是分辨率。各种能力都有一定的限界,既互相作用、又互相制约。改善和提高了某种能力,同时降低了某些能力。只能顾其主要,兼及其它,综合筹统。

(一) 数值孔径(numerical aperture)

物镜的数值孔径是显微镜极为重要的参量, 直接决定显微镜的光学能力。它是物镜分辨本领的量度。

数值孔径(N. A.) 是物镜和被检样品之间的介质的折射率(n) 与物镜所接受的光锥顶角(亦称孔径角)的一半 α (半孔径角)正弦的乘积。其公式如下:

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

显微镜准焦后, 物镜前透镜最边缘斜光线与显微镜光轴所成角 α , 即物镜的半孔径角。

准焦的显微镜, 在物镜前透镜与被检样品间的一定距离, 物镜只能收集从样品射出的全部光线中一个有限光锥(两个 α)。于是角 α 或其正弦值, 可用来度量物镜的集光能力, 这对分辨力和影像亮度都是重要的。 α 或 $\sin \alpha$ 值决定于前透镜与盖玻片间介质折射系数。使用干燥系物镜时, 介质是空气, 折射率为 1; 使用水浸系物镜时, 水的折射率为 1.33; 使用油浸物镜时, 油的折射率为 1.515。干燥物镜的 N. A. 一般为 0.05~0.95; 水浸系物镜为 0.1~1.20; 油浸系物镜为 0.83~1.40。

物镜的数值孔径愈大, 显微镜的能力愈强, 数值孔径与分辨率成正比, 与焦点深度成反比。物镜的数值孔径, 通常简称为 N. A. 和 Num. Apert. 等。N. A. 值刻在物镜壳上, 如 40/0.65 表示 40 倍的物镜, 数值孔径为 0.65。物镜的数值孔径随前透镜直径的减少而增大。显微镜物镜的前透镜口径愈小, 数值孔径愈大, 放大倍数愈高, 价格愈高。

(二) 分辨率(resolving power)

物镜分辨力是指分辨被检样品微细结构的能力。通常以能清晰地分辨两个物体点的最短距离来表示。其公式如下:

$$R = \frac{0.61 \times \lambda}{N. A.}$$

R : 分辨率(两点的最短距离)

λ : 照明光线波长

N. A.: 物镜数值孔径

分辨率以分辨两个点的最短距离表示, R 值愈小, 分辨能力愈大。物镜的分辨率与照明光线的波长成反比, 与物镜的数值孔径成正比。

照明光线波长愈短, 物镜的数值孔径愈大, 显微镜的分辨率亦愈大。

照明的可见光波范围为 400~700nm, 在计算上, 一般取波长的平均值 550nm 作为照明的入射光波长。

目前油浸物镜的最大数值孔径为 1.4, 使用可见光中波长最短的 400nm 的紫色光照明, R 值近 0.2 μm 。该值为光学显微镜的所能清晰分辨两物点的最小距离, 亦即分辨的最高能力。两物点距离小于 0.2 μm , 不能分辨, 两点被看作一个点。

物镜的分辨力即显微镜的分辨率, 目镜与显微镜的分辨力无关, 它只把物像第二次放大, 使眼睛便于观察。目镜只能将物镜已经分辨的影像进行放大, 无法观察到未被物镜分辨的细节。在光学成像过程中, 目镜不起初始造像作用, 仅作放大而已。

(三) 放大率(magnification)

显微镜最后形成的物体放大影像, 对被检物体的大小比例称为放大率, 即像高比物高。放大倍数以长度计算, 而不是以面积或体积计算。

某些显微镜为适应不同需要, 镜筒内装有倍数不同的附加透镜系统。在专用的显微摄影装置中, 附有摄影透镜(photographic lens)。显微摄影总放大率的计算, 除目镜、物镜的放大率外, 摄影

透镜的放大率亦要计算在内。

显微镜的总放大率(M_t)应为:

$$M_t = M_{ob} \times M_e \times M_{ph}$$

M_{ob} :物镜放大率

M_e :目镜放大率

M_{ph} :摄影透镜放大率

一般镜检观察时,摄影附加透镜的放大倍率不计算在内,因它未参与造像。显微镜辨别微细结构的能力,不取决于总放大率,而归于物镜的分辨率。显微镜的总放大率,绝非愈高愈好,有其适量范围:最低和最高界限。适宜的总放大率是所用物镜数值孔径的500~1 000倍。在此范围称作有效放大率。例如,使用40/0.65物镜时,应选配适宜的目镜倍数范围。

首先计算出有效放大倍率:

$$0.65 \times 500 \sim 0.65 \times 1\,000 = 325 \sim 650$$

再用物镜放大倍率除有效放大率:

$$325 \div 40 \sim 650 \div 50 = 8 \sim 16$$

求得的数值是应选配的目镜放大倍率的范围,即要选用8×~16×的目镜。

总之,总放大率超过物镜数值孔径的1 000倍时,微细结构分辨不消,为空的放大,低于500倍时由于放大率过低,肉眼难以分辨。

(四)焦点深度(depth of focus)

当显微镜对被检样品的某一点或平面准焦时,影像的清晰范围,不局限于这一点或面,在其上下的一定距离或深度内也是清晰的。这段清晰的距离或深度,就叫做焦点深度,简称焦深。焦深长表示清晰的上下范围或深度大,焦深短,清晰的上下界限短。

显微镜的焦深可变,它与物镜的数值孔径和总放大率相关。焦深与物镜的数值孔径和总放大率成反比。收小孔径,影像的焦深加大,提高物镜的数值孔径,清晰深度变小。总放大率提高,焦深变小,总放大率降低,焦深加大。使用同一物镜,配用不同倍率的目镜,其焦深随目镜倍率加大而减少。

四、显微镜的使用

正确、合理地使用显微镜,是做好镜检和显微摄影的前提。

(一)光路合轴调整

照明光束应与显微镜的光轴合一,使光源均匀地照明视场。镜检和摄影前,光路要合轴调整,使照明光束与显微镜的光轴于同一轴线上。光路系统中的目镜、物镜和视场光阑位置固定,勿需调整;仅聚光器可调。因此,光路的合轴实为聚光器和光源灯的调中。

1. 聚光器的调中

聚光器的调中步骤如下(图1-2):

- (1)转动聚光器升降旋钮,把聚光器升至最高位置。
- (2)接通光源灯的电源开关。
- (3)将制片标本放在载物台上,用4×或低倍物镜对样品聚焦。
- (4)缩小视场光阑,在视场中可见边缘模糊的视场光阑图像。
- (5)微降聚光器,至视场光阑的图像清晰聚焦止。
- (6)用聚光器两个调中的螺杆推动聚光器,使缩小的视场光阑的图像,调至视场中心。
- (7)开放视场光阑,使多角形的周边与视场边缘相接。
- (8)反复缩放视场光阑,确认光阑中心和边缘与视场完全重合。

(9)使聚光器回复顶点位置。

在视场中,通过观察视场光阑影像的相对移动,使聚光器调中,达到光轴合一。

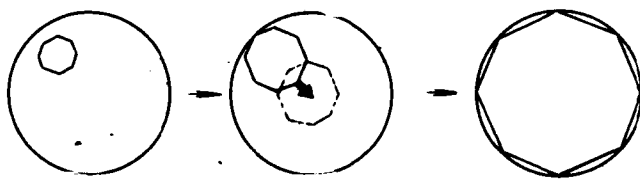


图 1-2 聚光器的调中

左:视场内一视场光阑像,偏左上,实与聚光器偏右下

中:向左上调整聚光器,视场光阑移向正中

右:开放视场光阑,使与视场边缘重合

聚光器的调中,即光路的合轴,是显微镜使用的“开始曲”,每次必做,并非一劳永逸,使用聚光器常出偏移,致使光轴歪扭。聚光器必须准确地对准中心,使其光轴与显微镜光学系统的光轴合一。调中要用两个调中螺杆调整,使其移向中心位置。聚光器调中的同时,亦要准焦,使透过聚光器的光线,恰好集中照射在被检样品处或拍摄的像场上。

2. 光源灯的调中

光源灯的方位可调,灯丝的影像在光路中可见。灯丝的位置并非永居中央,在使用中随时注意调中。为保证视场的照明强度和均一,必须进行灯丝的调中使投射的光束和光轴合一。其调整方法如下:

将光源灯拧紧或插入灯座上,固紧于灯室或镜座中。转动灯座或灯室上的垂直、水平调节螺丝,使灯丝调中,位于视场中心(图 1-3),灯丝的图像可于两处观察:

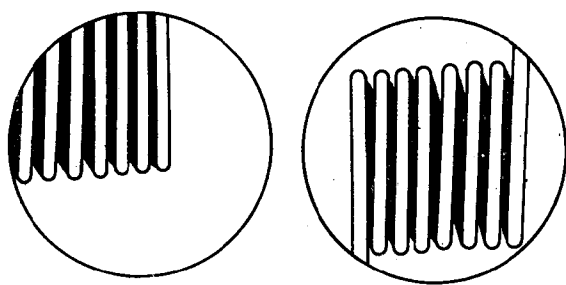


图 1-3 光源灯调中

左:调中前

右:调中后

(1)在视野光阑上面的滤色镜座上,放一磨砂玻璃或乳白滤色镜,用以观察灯丝像的位置,至调中止。

(2)灯丝聚焦后,从镜筒中取下目镜,在物镜的后焦面上,可见到灯丝清晰图像。

两法之中,前法可取,简便易行。

(二)物镜和目镜的选用与组合

物镜参与造像,目镜将影像二次放大,并投射到焦平面上,选用优质的物镜与目镜是至关重要

的。

1. 优质接物镜

在诸多的物镜当中,以平场复消色差物镜为好,其镜壳上的标志为:PL·APO,PL·FL 和 PL 亦可选用。

2. 适宜的目镜

目镜把物镜映来的影像第二次放大,并校正物镜残余下的像差,以提高成像质量。目镜作为投影器,把放大的影像投射到照相机身的胶片面上。选用与物镜配套的目镜,各厂家都有专用的摄影目镜,不可任意滥用。

观察镜检用目镜,不能用做摄影用。

3. 物镜与目镜的组合

物镜和目镜的种类繁多,怎样选用性能更佳,涉及两者的匹配或组合。要考虑下述几个问题。

(1)分辨率

物镜的分辨本领是决定物镜质量的关键。它取决于物镜的数值孔径,两者呈正比。数值孔径大,分辨能力强。数值孔径与放大倍数相关,放大倍数高,数值孔径亦大。

物镜倍数	4×	10×	20×	40×	100×
数值孔径	0.1	0.25	0.40	0.65	1.25

上列数字表明,随放大倍数的加大,数值孔径相应提高,分辨力随之增大,欲提高对样品细节的分辨能力和清晰度,必须使用高数值孔径的物镜。目镜应视影像的大小和视场宽度,选用低倍的目镜为主。选用数值孔径不同的物镜,尽管总放大率相等,其分辨距离相差甚殊。

(2)有效放大率

显微镜的有效放大率,为所用物镜数值孔径为 500~1 000 倍。高于所得放大叫做“空的放大”,倍数低于 500 总放大倍数太小,物镜分辨能力不能充分发挥,本可辨认的细节,由于倍数太小,难以分辨。

(3)焦点深度和视场宽度

焦深大,清晰的深度大,焦深小,清晰的深度小。缺少足够的焦点深度,难把众多的影像清晰地映现在一个视场内。数值孔径小,放大倍数低的物镜和目镜,焦深长。只有选用数值孔径小和放大倍数低的物镜和目镜,加长焦点深度,才能把处于不同水平层次的样品影像清晰地映入同一视场内。

视场宽度与显微镜的总放大率成反比,使用高倍物镜和目镜,视场缩小难在同视场内容纳更多的影像,改用低倍的物镜或目镜,降低总放大率,扩大视场,直至包括了所需的样品影像。

综上所述,选用物镜和目镜主要着眼于提高影像的分辨率和清晰度,兼顾焦点深度和视场宽度,即选高数值孔径的平场复消色差中、高倍油物镜,并选用相应的低倍目镜或平场目镜。焦深和视场不足时,适当调换物镜,降低数值孔径或放大倍数。

(三)光阑及其使用

显微镜有两种光阑:视场光阑和孔径光阑。视场光阑控制照明束,限定视场大小。孔径光阑通过光阑的放缩,限定聚光镜的孔径大小。两者皆为可变光阑(iris diaphragm),正确调节和使用光阑,是保证镜检和摄影质量的重要环节。

1. 孔径光阑的调节使用

视场内的影像不同于一般景物。其最大的区别是影像反差小,焦深浅,这可随孔径光阑的缩小而提高。孔径光阑小于物镜的数值孔径时,物像的分辨力和亮度降低。影像反应和焦点深度提高,