

细胞生物学实验指导

主 编 李素文



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验指导 / 李素文 主编. - 北京: 高等教育出版社;
海德堡: 施普林格出版社, 2001. 10
理工科本科生教材
ISBN 7-04-010353-2

I. 细… II. 李… III. 细胞学: 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(2001)第 068712 号

封面说明: 上左: 用 p 103 - 162Bid - GFP 转染的 HeLa 细胞的绿色荧光; 上右: 用 MitoTracker 标记 HeLa 细胞线粒体的红色荧光; 下左: 用 p 103 - 162Bid - GFP 转染的 HeLa 细胞的绿色荧光; 下右: 用 MitoTracker 标记 HeLa 细胞线粒体的红色荧光。Bid 蛋白是介导线粒体释放细胞色素 C 的促凋亡因子, 从与线粒体共定位看, 上边一组照片显示: Bid 的 132 - 162 结构域具有促凋亡功能这些照片是由美国德州达拉斯 (Dallas) 西南医学中心方敏博士、Mike Lutte 博士和王晓东教授惠赠。

责任编辑 邹学英 封面设计 张楠
版式设计 李杰 责任印制 陈伟光

细胞生物学实验指导

李素文 主编

出版发行 高等教育出版社 施普林格出版社

社址 北京市东城区沙滩后街 55 号 邮政编码 100009
电话 010 - 64054588 传真 010 - 64014048
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经销 新华书店北京发行所
印刷 北京民族印刷厂

开本 850 × 1168 1/16 版次 2001 年 10 月第 1 版
印张 13.25 印次 2001 年 10 月第 1 次印刷
字数 300 000 定价 16.50 元

© China Higher Education Press Beijing and Springer-Verlag Heidelberg 2001

版权所有 侵权必究

前 言

细胞是生物的基本构成单位,细胞生物学是研究细胞结构与功能的科学。生命科学的进展与对细胞的不断深入研究是分不开的,所以细胞生物学是高校生命科学的主干课程之一。而作为实验科学的细胞生物学除了理论教学之外还需开设实验课程,以使学生掌握有关细胞生物学的基本研究手段和方法。纵观细胞生物学的发展,如果没有光学及电子显微镜的发明以及其他研究方法和手段的建立是很难想象的。

细胞是那样小那样精巧,但却包含了生命的全部信息。如何观察细胞、培养细胞、从细胞中提取生命的信息,这是多么令人向往的工作。本书希望能引导学生在学习细胞生物学基本理论的同时,从观察细胞开始,逐步掌握细胞生物学的基本实验原理和方法。

本书含两个部分和一个附录,为便于查找,书中各部分明确地指出它们之间的相互联系。第一部分是细胞生物学实验方法和技术介绍,包括光学显微镜、电子显微术、定量细胞术、显微摄影、放射性核素示踪技术、细胞培养技术、凋亡细胞的识别、绿色荧光蛋白、反转录聚合酶链式反应 9 项内容;第二部分为学生实验,共选择了 15 项实验,包括口腔上皮细胞的显微镜观察、电镜超薄切片、动物细胞培养、显微摄影、定量细胞测量的样品制作、小鼠骨髓染色体的制备与 C 带染色、保护性胶显影剂和硝酸银染核仁组织区的一步染色法、细胞骨架观察、HeLa 细胞与鸡红细胞的融合实验、小鼠巨噬细胞吞噬羊红细胞实验、着丝点蛋白的间接免疫荧光染色法、三尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞凋亡的形态和生化特征观察、利用脂质体转染技术对 HeLa 细胞中重组 GFP 进行观察、利用 RT-PCR 技术检测 HeLa 细胞中 β -actin 的表达、放射性核素示踪技术及其应用;附录中简明地列出各项实验所需的实验条件。

本书是刘凌云教授等主编的《细胞生物学》的配套教材,是应高教出版社的邀请而编写的。实验内容主要根据北京师范大学生命科学学院近 20 余年来开设细胞生物学实验课程的经验编写,也有一部分来自师生的科研成果。

本书由多年来从事细胞生物学教学和科研的教师执笔,柳惠图教授审阅了全书,提出了许多宝贵意见。此外,任海云、姜国华、李艳平和北京鼎国生物技术发展中心周卫东等同志为本书的编写和实验工作提供了很多帮助,在此一并表示感谢。

本书可供大专院校生物科学和生物技术专业的教师和学生使用,也可供从事相关专业的教师和学生参考,各校在使用这本教材时可根据自身的条件进行实验或示范,不必拘于本书实验内容,可自行增删。

由于编者的水平有限,本书难免存在缺点和错误,恳请使用本书的师生和读者给予批评指正。

李素文 薛绍白

2001 年 8 月

目 录

第一部分 细胞生物学实验方法和技术介绍

第一章 光学显微镜	(3)
一、明视野显微镜.....	(3)
二、暗视野显微镜.....	(5)
三、相差显微镜.....	(6)
四、微分干涉差显微镜.....	(7)
五、荧光显微镜.....	(8)
六、偏光显微镜.....	(9)
七、激光扫描共焦显微镜.....	(9)
八、多光子荧光显微镜.....	(10)
第二章 电子显微术	(12)
一、透射电子显微术.....	(12)
二、扫描电子显微术.....	(15)
三、电镜 X 射线微区分析技术.....	(17)
第三章 定量细胞术	(20)
一、显微镜光度术.....	(20)
二、流式细胞术.....	(24)
三、图像处理和分析技术.....	(26)
第四章 显微摄影	(30)
一、显微摄影装置.....	(30)
二、显微摄影程序.....	(32)
三、彩色显微摄影.....	(35)
四、荧光摄影.....	(36)
第五章 放射性核素示踪技术	(37)
一、放射性核技术的核物理基础知识.....	(37)
二、生物学中放射性核素示踪技术.....	(40)
三、放射性样品的测量仪器及方法.....	(43)
四、放射性核素示踪实验中的放射卫生防护.....	(53)
第六章 细胞培养技术	(58)
一、组织培养的概念.....	(58)
二、组织培养简史.....	(59)
三、组织培养的基本条件.....	(59)
四、培养方法.....	(61)
五、培养细胞的生物学.....	(61)
第七章 凋亡细胞的识别	(68)
一、细胞凋亡与细胞坏死在形态学和生化特征方面的区别.....	(68)

二、调亡细胞的分子作用机制简介	(69)
三、观察调亡细胞的方法	(71)
四、研究细胞调亡的生物学意义	(74)
第八章 绿色荧光蛋白	(76)
一、GFP 的发现	(76)
二、GFP 的性质	(76)
三、GFP 的发光机制与 GFP 突变蛋白	(76)
四、GFP 的优点	(79)
五、GFP 的应用前景	(80)
六、存在的问题	(81)
第九章 反转录聚合酶链式反应	(82)
一、逆转录酶	(82)
二、反转录引物	(83)
三、模板 RNA	(84)
四、反转录 PCR(RT-PCR)的应用	(85)
五、存在的问题	(86)

第二部分 学生实验

实验 1 口腔上皮细胞的显微镜观察	(91)
一、用荧光显微镜观察口腔上皮细胞的线粒体和细胞核	(91)
二、用相差显微镜观察口腔上皮细胞	(93)
三、用暗视野显微镜观察牙垢中的微生物	(95)
实验 2 电镜超薄切片	(97)
实验 3 动物细胞培养	(103)
一、清洗与灭菌	(103)
二、培养基的配制	(108)
三、Hanks、D-Hanks 液和消化液(胰酶液)的配制	(110)
四、细胞传代培养	(113)
五、生长曲线的测定	(114)
六、细胞冻存与复苏	(116)
七、原代培养	(118)
八、新生牛血清的筛选	(119)
九、几种常用的细胞同步化方法	(121)
实验 4 显微摄影	(126)
实验 5 定量细胞测量的样品制作	(129)
一、细胞 DNA 含量定量测量的样品制作(Feulgen 反应——用于显微镜光度计和图像分析仪的透射光测量)	(129)
二、细胞 DNA 含量定量测量的样品制作(PI 荧光标记法——用于流式细胞仪的荧光测量)	(131)
实验 6 小鼠骨髓染色体的制备与 C 带染色	(134)

一、小鼠骨髓染色体的制备	(134)
二、染色体 C 带的制备	(136)
实验 7 保护性胶显影剂和硝酸银染核仁组织区的一步染色法	(138)
实验 8 细胞骨架观察	(141)
一、考马斯亮蓝 R250(Coomassie blue R250)染色法观察微丝	(141)
二、罗丹明标记的鬼笔环肽染色法观察微丝	(143)
三、动物细胞微管观察	(145)
四、植物细胞微管观察	(147)
实验 9 HeLa 细胞与鸡红细胞的融合实验	(149)
实验 10 小鼠巨噬细胞吞噬羊红细胞实验	(151)
实验 11 着丝点蛋白的间接免疫荧光染色法	(153)
实验 12 三尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞凋亡的形态和生化特征观察	(156)
一、三尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞凋亡的形态观察	(156)
二、三尖杉酯碱诱导 HL-60 细胞凋亡的生化特征观察	(158)
实验 13 利用脂质体转染技术对 HeLa 细胞中重组 GFP 进行观察	(161)
实验 14 利用 RT-PCR 技术检测 HeLa 细胞中 β -actin 的表达	(163)
实验 15 放射性核素示踪技术及其应用	(166)
一、放射性核素制剂的衰变校正计算	(166)
二、几何位置对测量的影响及外照射防护原则	(167)
三、 ^3H -TdR 掺入细胞 DNA 的液闪测量	(168)
四、 ^3H -TdR 掺入 DNA 的显微放射自显影观察	(170)
五、皮质醇放射免疫分析	(173)

附 录

附录 1 显微镜物镜、目镜常用的一些符号说明	(179)
附录 2 电镜超薄切片缓冲液、固定液和染液的配制	(180)
附录 3 动物细胞培养	(182)
附录 4 显微摄影和显微放射自显影用溶液的配制	(184)
附录 5 常用荧光探针介绍	(186)
附录 6 用于 Feulgen 反应的试剂配制	(188)
附录 7 磷酸缓冲盐(Phosphate-buffered Saline, PBS, pH 7.4)溶液的配制和 各种 pH 值 Tris-HCl 缓冲液的配制	(189)
附录 8 用于染色体和 C 带制备的溶液配制	(190)
附录 9 用于细胞骨架观察的溶液配制	(192)
附录 10 用于动物细胞融合和吞噬实验的试剂配制	(194)
附录 11 防荧光褪色固片介质、细胞粘附和封片剂	(195)
附录 12 对 HeLa 细胞中重组 GFP 进行观察的试剂配制	(197)
附录 13 利用 RT-PCR 技术对 HeLa 细胞中 β -actin 的表达进行检测的 试剂配制	(199)
附录 14 放射性核素示踪技术常用数据	(200)

第一部分

细胞生物学实验 方法和技术介绍

第一章 光学显微镜

细胞的发现与光学显微镜(light microscope)的发明分不开。最早的显微镜是荷兰眼镜商 Janssen(1588—1628)于 1604 年制造的。半个多世纪后,英国物理学家 Hooke(1663—1703)创制了第 1 架具有科学研究价值的显微镜,他首次观察了木栓的显微图像,发现了细胞。真正观察到活细胞的是荷兰科学家 Leeuwenhoek(1632—1723),他用自制的显微镜观察到了池塘水中的原生动物、人和哺乳动物的精子和细菌等,为光学显微镜的发展作出了重大贡献。此后,光学显微镜的研究和制造技术发展很快,适用于各种用途的光学显微镜被制造出来。

国外一些大的生产光学显微镜的厂家有日本的 Olympus、Nikon,德国的 Zeiss、Leica;国内的重庆光学仪器厂等厂家生产的组合式显微镜具有多种功能。多功能组合式显微镜是指在一台主体显微镜的基础上,配置有多种光学和机械组件,换用不同的组件,可进行显微镜功能的转换。最常见的可转换为明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、荧光显微镜等。下面就这几种常用显微镜的光路和用途作简要说明,在第二部分实验 1 对活细胞的显微镜观察中列举了对暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜的具体使用步骤,便于熟悉使用。

一、明视野显微镜(bright field microscope)

明视野显微镜是最通用的一种光学显微镜。利用光线照明,标本中各点依其光吸收(即光的振幅发生变化)的不同而在明亮的背景中成像。它由物镜、目镜、聚光镜、光源、载物台和支架等部件组成。其中聚光镜用于调节显微镜的照明,物镜和目镜是放大微小物体成像的主要部件。由同轴的 2 个正透镜——物镜和目镜组成的显微镜称为复式显微镜。其基本原理是(图 1-1-1)光通过物镜在镜筒中形成物体(AB)的中间实像(A'B'),再通过目镜放大,或在接近标本平面处形成放大的虚像(A''B''),经人眼处理后,在视网膜上形成一个正立的像;或在目镜上方的照相底片上形成一个实像。

在光学显微镜中,有两方面原因影响成像:一个是透镜本身存在着一系列缺陷(由材料和工艺造成);另一个是由于光学系统物理条件的限制而造成的像差。像差分 2 种类型:一种是多色光成像时,由于介质折射率随光的波长不同而变所引起的像差,称为色差;另一种是单色像差,单色像差又分为球差、彗差、像散、像场弯曲(简称为场曲)和畸变等。用组合透镜可以纠正一定程度的像差。一般对物镜的球差都进行了校正,校正 2 种颜色

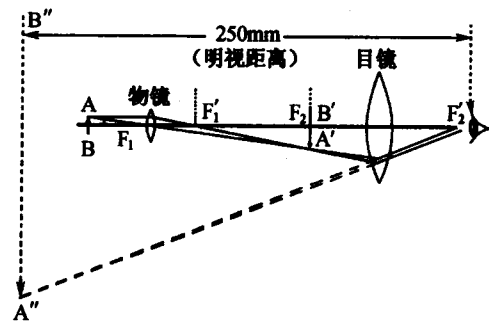


图 1-1-1 明视野显微镜示意图

F_1 . 物镜的前焦点; F_1' . 物镜的后焦点;

F_2 . 目镜的前焦点; F_2' . 目镜的后焦点

(蓝和红)色差的物镜称为消色差物镜,校正3种颜色(蓝、绿和红)色差的称为复消色差物镜,居于二者之间的称为半-复消色差物镜。平场物镜纠正了场曲,适用于显微摄影。通常的物镜适用于0.17 mm厚度的盖玻片,但实际上盖玻片的厚度变动于0.15~0.22 mm之间,易造成像差,因而有些物镜上装置了“校正环”用来补偿盖玻片厚度的变化。

目镜用于放大物镜形成的中间像,也用于校正中间像中的残余像差。目镜有5~20x的放大倍数。惠更斯目镜是最常用的一种目镜;补偿目镜是与复消色差物镜组合使用的,以补偿复消色差物镜的放大率色差;为了保持最小畸变的平面场,设计了投影或摄影目镜,用于显微投影或摄影;长出瞳目镜适用于戴眼镜者观看;广视场目镜可观察到较大的视场。镜筒分为单目、双目、三目3种。三目镜筒的2个目镜用于观察,第3个用于显微摄影、投影或测量。

显微镜的光学系统包括2条光路:照明光路和成像光路。聚光镜是照明光路中的重要组件,用于集中从光源来的光线,使被观察的标本得到明亮和均匀的照明。常用的有由2个透镜组成的阿贝聚光镜。正确使用聚光镜系统对于发挥显微镜的分辨力和增强像的反差有很大的作用。明视野显微镜的照明光路根据设计不同,有2种类型的照明方式:一种较简单的照明方式称为临界照明(critical illumination),即在光源和物体之间设有一个简单的聚光镜(也称聚光器),调节这个聚光镜的位置,可使光源灯丝的像聚焦且叠加在标本平面上,所以使标本照明不均匀;另一种为现代显微镜设有的柯勒照明(Köhler illumination)系统,在照明光路中除有聚光镜外,还在放置光源的灯室内设有集光镜(也称集光器),经过这个柯勒照明光路后,光源灯丝的像就不再叠加在标本平面上,而是在标本平面上呈现一个照明光场,这个照明光场实际上是视场光阑(作为物)经聚光镜后在标本平面上的成像。所以,可通过调节聚光镜的位置使这个照明光场的边界聚焦清楚;可通过调节视场光阑的大小改变这个照明光场的大小;可通过调节聚光镜上的调中螺旋调中这个照明光场的位置。柯勒照明比临界照明优越之处表现在:其一是照明均匀,因为在标本平面上成像是视场光阑而不是灯丝,其二是通过调节视场光阑的大小和位置可以控制标本平面上照明区的大小和位置(图1-1-2)。当只需要观察或测量标本的一部分时,通过关小视场光阑,可以减少照明区域,使标本的其他部分不受热,并且减少了杂散光的干扰。所以这种照明方式已成为显微摄影、透射光显微分光光度测量、透射光图像分析、相差显微镜调节、微分干涉差显微镜调节等必要的调节环节,因此需首先弄清楚有关部件(如聚光镜的调焦和调中旋钮、聚光镜上孔径光阑、集光镜和视场光阑)在显微镜上的位置。在使用正置和倒置显微镜时,应注意辨别孔径光阑和视场光阑

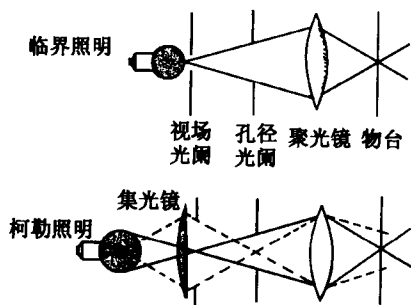


图1-1-2 柯勒照明和临界照明的光路

的上下位置。一般孔径光阑总是靠近聚光镜一侧,视场光阑总是靠近光源一侧。调节柯勒照明的基本步骤是:①将视场光阑关到最小;②调节聚光镜聚焦旋钮,在显微镜中将视场光阑聚焦清楚;③用聚光镜调中旋钮,使视场光阑的像移至视场中央(调中聚光镜);④打开视场光阑,使其边缘与视场同样大小(防止标本不必要的受热,防止杂散光)。应反复训练以便熟悉这种柯勒照明的调节方法。

分辨力、反差和放大倍数是光学显微镜的几个基本参数。显微镜的分辨力是影响显微镜成像清晰度的关键。显微镜的最小分辨距离指将物体放大成像后,能将物体相近两点分辨清楚的最短距离,通常以 D 表示, D 越小,显微镜的分辨力越高。

$$D = 0.61 \lambda / N.A. \quad N.A. = n \cdot \sin u$$

式中 λ 为光波波长; $N.A.$ 为物镜的数值孔径(数值孔径越大,分辨力越高); n 为物镜与标本间介质的折射率; u 为镜口角也称孔径角,孔径角指入射光束与物镜光轴之间的夹角(图 1-1-3)。以此式计算,显微镜的最小分辨距离为 $0.2 \mu\text{m}$,或说 200 nm 。从公式可以看出:入射波长越短(如电子显微镜)、介质折射率越高(如油)和孔径角越大,显微镜的分辨力越高。浸液物镜(浸油、水或其他化合物)可以增加数值孔径,提高物镜的分辨力。荧光显微镜中常用 $40 \times$ 或 $60 \times$ 数值孔径为 1.30 的浸液物镜,以增强收集荧光的能力。



图 1-1-3
透镜的孔径角

在显微镜的物镜上一般都标出数值孔径值($N.A.$)、放大倍数有关数值,聚光镜上也标有 $N.A.$ 值,所标的 $N.A.$ 值是指物镜或聚光镜最大的数值孔径。实际应用时,通过调节聚光镜上孔径光阑大小可以改变孔径角,也就改变了有效的 $N.A.$ 值,实际上控制了进入光学系统中光能量的多少。另外,孔径光阑的开大或缩小除了影响显微镜的分辨力外,还影响显微镜的反差、有效放大倍数等,所以在作显微摄影、显微镜观察或测量时,应注意调节孔径光阑的大小。

反差指显微镜形成的影像与背景之间的光强度之差。对于明视野显微镜来说,通过改变聚光镜孔径光阑的大小可以调节反差。孔径光阑越大,反差越小(但分辨力增高);反之,孔径光阑越小,反差越大(但分辨力降低)。因此在实际应用特别在作显微摄影时,孔径光阑开的大小,应兼顾分辨力和反差。具体调节方法是:由于孔径光阑大小所呈的像在物镜的后焦面上,摘下一个目镜,插入一个聚焦望远镜,可以观察到物镜的后焦面,同时也观察到孔径光阑开的大小,这时调节孔径光阑杆,使得孔径光阑的大小约为物镜后焦面的 $2/3$,这样基本上可兼顾显微镜的分辨力和反差,显微摄影时可获得较好的影像效果。为了提高显微镜的反差,除在上述明视野显微镜中,适当关小孔径光阑、将标本进行染色处理外,在显微镜成像技术方面,发展了多种类型的显微镜,如暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、偏光显微镜等,都为提高反差作出了贡献。

显微镜的放大倍数为物镜与目镜放大倍数的乘积,如果这个乘积落在 $500 \times$ 物镜 $N.A. \sim 1000 \times$ 物镜 $N.A.$ 之间,则被称为有效的放大倍数。这个乘积如果低于上述范围,就不足以观察到标本的细节;如果高于上述范围,也是空放大,即不能看到更细的细节。用绿光照明时,最好的光学显微镜的放大倍数约为 $1500 \times$ 。

二、暗视野显微镜(dark field microscope)

暗视野显微镜是为了提高反差设计的一种光学显微镜,在组合式显微镜中装入暗视野聚光镜就成为暗视野显微镜。

暗视野显微镜的照明光路如图 1-1-4 所示,不像明视野显微镜中的聚光镜那样,照明光线可直接进入聚光镜,再进入物镜而成像;暗视野聚光镜的作用是遮拦掉中间的大部分照明光线,使照明光线形成一个空心光锥,以倾斜的光线照射到标本上。因此标本的像

主要是由标本散射的光线形成,而标本周围的背景由于不能散射光线,因此看上去暗视野显微镜形成的像,背景是黑暗的,标本是亮的,好像是黑夜中的星空。由于暗视野显微镜增大了反差,所以适合于观察单细胞有机体、硅藻、细菌、细胞中的线状结构如鞭毛和纤维等,常用于微生物和胶体化学的研究。暗视野显微镜不适合观察染色的标本,因为染色后,减少了标本和周围介质之间折射率的差别,使暗视野的影像质量变差。

暗视野聚光镜有抛物面型(*N.A.*值较低)和心型(*N.A.*值较高,油浸)2种。使用时应注意暗视野聚光镜的*N.A.*值要大于所用物镜的*N.A.*值,防止直射光进入物镜。暗视野显微镜的调节和使用详见第二部分实验1。

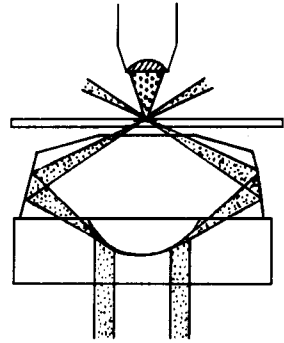


图 1-1-4 暗视野聚光镜示意图

三、相差显微镜(phase contrast microscope)

相差显微镜是在光学显微镜发展史上的一项创新技术。

19世纪30年代荷兰物理学家 Zernike 首先设计、并于 1942 年制造了第 1 台相差显微镜,由于此项发明,Zernike 于 1953 年获诺贝尔奖。

人的眼睛只能鉴别可见光波长(颜色)和振幅(强度)的变化,不能鉴别相位的变化。但是大多数活的生物样品高度透明,光波通过后振幅基本不变,却存在相位的变化,只是人的眼睛感觉不到。Zernike 设计的相差显微镜,能将人眼看不见的样品本身的相位差(或光程差)转变为人眼能看见的振幅(光强度)变化。

从相差显微镜示意图 1-1-5 中可以看出,从结构上看相差显微镜与一般显微镜不同之处在于:相差显微镜的聚光镜具有环状光阑,物镜的后焦面处装有相位板。

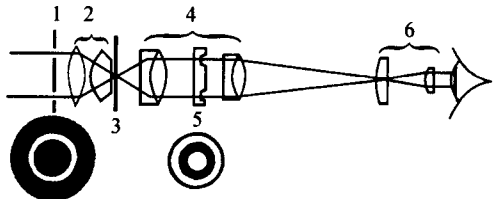


图 1-1-5 相差显微镜示意图

- 1. 环状光阑; 2. 聚光镜; 3. 标本;
- 4. 物镜; 5. 相位板; 6. 目镜

相差显微镜的基本原理是:光线通过标本后,产生直射光线和衍射光线,直射光线和衍射光线干涉后将在像平面上成像。对于已染色的标本而言,由于标本各点吸收光不同,直射光线和衍射光线在像平面上干涉后成为一个眼睛可以感知的亮度(振幅)有变化的像;

如果光线通过的是活细胞,亮度或振幅的变化没有或很小,但直射光线超前于衍射光线 $1/4$ 波长,二者干涉后人眼感觉不到。为了人眼能感知,相差显微镜进行了巧妙的光学设计:在物镜后焦面处设有环形的相位板,在聚光镜上设有环状光阑,并且设计环状光阑的像恰好在物镜后焦面上。由于相位板材料的光学特性和厚度可人为控制,可使通过它的直射光线超前或滞后衍射光线 $1/4$ 波长。如果使用令直射光线超前 $1/4$ 波长的相位板,直射光就较衍射光共超前 $1/2$ 波长,直射光和衍射光干涉后,光波振幅减弱,造成像暗背景亮,称为正相差;反之,如果使用令直射光线滞后 $1/4$ 波长的相位板,直射光将与衍射光同相位,直射光和衍射光干涉后,光波振幅增强,造成像亮背景暗,称为负相差。因此,相差显微镜实现了从相位差(或光程差)向振幅差(光强度差)的转变。为了确保直射光线通过相位板,使用时必须先摘下一个目镜,插入

一个聚焦望远镜,观察物镜后焦面上环状光阑和相位板的像,一边观察,一边用聚光镜调中螺旋调节环状光阑的位置,当调节到环状光阑的亮光环与相位板的环吻合时,说明直射光线通过了相位板,相位被改变 $1/4$ 波长,这时,就可在目镜中观察到一个质量很好的相差显微镜像。详细调节步骤见第二部分实验 1。相差显微镜可用于观察活细胞、未染色的组织切片或缺少反差的染色标本。由于操作简便,所以成为生物学和医学中最常用的观察显微镜。

四、微分干涉差显微镜(differential interference contrast microscope)

微分干涉差显微镜与相差显微镜一样,也是能将人眼看不见的物体本身的相位差(或光程差)转变为人眼能看见的振幅(光强度)变化的显微镜。不同之处是相差显微镜是根据通过物体的直射光线和衍射光线之间的相位差设计的;而微分干涉差显微镜是一种特殊形式的干涉显微镜,它是根据通过物体内只分开 $1\ \mu\text{m}$ 或者更短距离的 2 束相干光之间的相位差设计的,使标本内邻近 2 点的光程差被显微镜中特殊的光学系统转变为振幅(光强度)的变化,从而可观察到标本内细微的结构,所以称为微分干涉差显微镜。根据照明方式,微分干涉差显微镜分为落射式和透射式 2 种,生物学和医学观察中多采用图 1-1-6 所示的透射式微分干涉差显微镜。

从微分干涉差显微镜的示意图可以看出,微分干涉差显微镜包含 2 块正交的偏光镜:一块靠近光源,称为起偏镜;另一块靠近目镜,称为检偏镜。在起偏镜和聚光镜之间放置第 1 块渥氏(Wollaston)棱镜,在物镜和检偏镜之间放置第 2 块渥氏棱镜,这就是微分干涉差显微镜的基本结构。其基本原理是:来自光源的自然光经起偏镜后成为线偏振光,以 45° 方位角(入射光偏振方向与晶体光轴之间的夹角)垂直入射到第 1 渥氏镜,这时入射偏光分解为振动方向互相垂直、传播方向一致的 O 光和 E 光,穿过第 1 渥氏镜的中心点后,由于晶体光轴方向的改变,O 光和 E 光从中心点发散开一个很小的角度,经过聚光镜后产生出间隔只有 $1\ \mu\text{m}$ 甚至间隔更短些的平行光束,穿过标本的 2 个点。由于光线通过标本 2 个点的光程长不同,2 束光线的相位都发生了变化,带有标本 2 个邻近点相位差信息的这 2 束线偏振光通过物镜后,会聚在第 2 渥氏镜的中心点,组合在一起的这 2 束线偏振光相位差不同,偏振方向互相垂直,不能直接干涉成像。当它们通过检偏镜后成为振动面相同、频率相同且具有一定相位差的相干光束,因而在中间像平面上形成干涉的物像。

实际使用时要注意:① 载玻片的厚度标准是 $1\ \text{mm}$;盖玻片的厚度标准是 $0.17\ \text{mm}$;载玻片和盖玻片一定要清洁。② 微分干涉差显微镜在检测灵敏度上有方向性(相差显微镜无方向性),应使用旋转载物台。③ 一般第 1 棱镜与聚光镜相连,第 2 棱镜与物镜相连,所以要匹配所使用的聚光镜和物镜。④ 根据各厂家的具体操作步骤依序进行操作:调焦标本,调节柯勒照明,调节起偏镜和检偏镜成为正交位置,调节与标本相应的理想干涉色,使形成很好的微分干涉差影像。

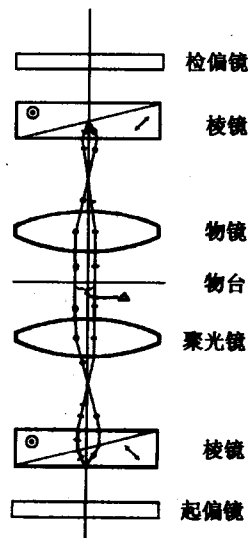


图 1-1-6 微分干涉差显微镜示意图

1955年法国物理学家 Nomarski 用诺氏棱镜取代了渥氏棱镜,经他这样改进后,能够制造出适合于不同放大倍数物镜观察的微分干涉差显微镜,称为诺曼尔斯基式微分干涉差显微镜。微分干涉差显微镜可以观察活的或未染色标本的精细结构,影像具有浮雕感,若以白光照明可以产生彩色影像,称为光染色。此外,这种显微镜操作也很方便,所以得到了广泛的应用。

五、荧光显微镜(fluorescence microscope)

荧光显微镜是利用较短波长的光使样品受到激发,产生较长波长的荧光,可用来观察和分辨样品中产生荧光物质的成分和位置。

任何一种荧光物质都有其特有的吸收光谱和荧光发射光谱,荧光发射光谱比吸收光谱的波长偏长波方向,但二者有部分重叠,例如标记细胞内总蛋白的异硫氰基荧光素(FITC)的吸收光谱和发射光谱,如图 1-1-7 所示。所以,荧光显微镜的光路设计必须分离开激发光和荧光,使观察者能够看到纯的荧光。

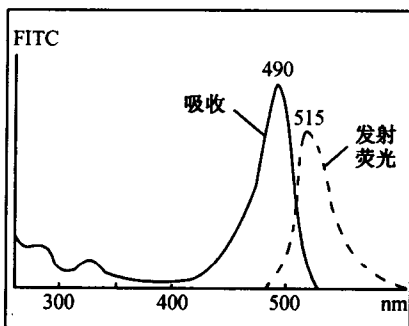


图 1-1-7 FITC 的荧光光谱

根据激发光照明方式的不同,荧光显微镜可分为透射式和落射式 2 种,生物学和医学观察中多用落射式荧光显微镜,其光路如图 1-1-8 所示。

从荧光显微镜光路图中可知,落射式荧光显微镜主要包括光源、激发滤片、双色反射镜、阻断滤片、物镜和目镜等几部分,它们在光路中的作用分述如下:

(1) 光源:高压汞灯或氙灯是常用的荧光激发光源。汞灯在 366 nm、405 nm、436 nm、546 nm、577 nm 处有很强的发射线,氙灯也在光的紫外区、可见区有较强的发射线。

(2) 激发滤片:放置于光源和物镜之间,其作用是选择适宜于激发欲观察荧光物质的波长范围。

(3) 双色反射镜:它的放置方向与激发光的方向呈 45°,具有一个特征波长值 M 。波长长于 M 的光波被透射,波长短于 M 的光波被反射。因此它是初步分离开激发光(较短波长)和发射荧光(较长波长)的一个重要组件。

(4) 阻断滤片:采用长波通滤片,即能使长于某波长的光通过,短于某波长的光不能通过。阻断滤片的作用是进一步使荧光与激发光分离,以获得更纯的荧光。内阻断滤片已固定在内部,外阻断滤片可根据需要装入或卸下。

(5) 物镜:由于激发标本和收集荧光都是由同一物镜实现的,所以物镜的选择对于荧光观察有重要作用。荧光物镜是能透过紫外光的特制物镜。荧光效率与所用物镜数值孔径

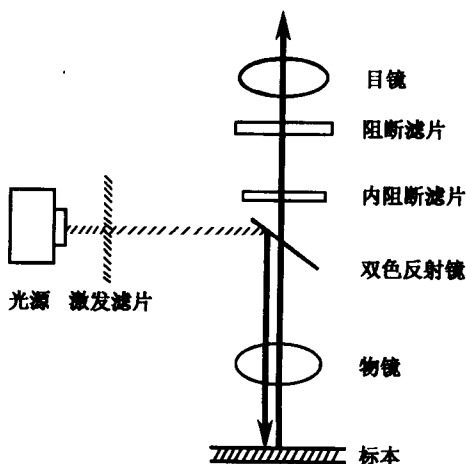


图 1-1-8 荧光显微镜示意图

的4次方成正比,所以用数值孔径较大的浸液物镜(水浸或油浸)效果较好,一些著名厂家生产了数值孔径为1.30的40x和63x荧光物镜,使用效果很好。

(6) 目镜:荧光亮度与目镜放大倍数的平方成反比,如6.3x目镜比10x目镜观察荧光更亮,所以可采用较低倍目镜观察。

从图1-1-8中可以看出,落射式荧光显微镜的光路为:从高压汞灯或氙灯发射出的激发光经激发滤片后,选择出适宜的激发光到达双色反射镜,经它分光后,较短波长的激发光反射下来,经物镜后激发样品,样品产生的荧光再经物镜后到达双色反射镜,经其分光作用,较长波长的荧光透射过去,经阻断滤片后进一步阻断掉一些短波长的激发光,使纯荧光到达目镜可供观察。对于一种荧光物质,应根据它的吸收光谱和发射光谱选择适宜的激发滤片、双色反射镜和阻断滤片。为了操作方便,并且获得更科学的匹配,荷兰科学家 Ploem 于 20 世纪 70 年代初发明了荧光垂直照明器装置。荧光垂直照明器将激发滤片、双色反射镜和阻断滤片组合成几组,使用十分方便。那时前西德莱茨厂(Leitz, 现称 Leica 公司)以他的名字命名荧光垂直照明器。现在很多著名国内外厂家生产的荧光显微镜都采用了这种装置。

在生物学和医学中主要观察几种类型的荧光:自发荧光、染色荧光、诱发荧光、免疫荧光和酶诱发荧光等,特别是近年来又用于观察荧光标记分子探针。所以包括荧光显微镜在内的荧光的观察、标记和测量技术在生物学和医学研究中获得了极其广泛的应用。

六、偏光显微镜(polarizing microscope)

偏光显微镜是用于观察双折射样品的显微镜。绝大多数结构规则的生物体系的折射率因光波传播方向而异,一般称为双折射体系。偏光显微镜的主要组成是在一般显微镜的光源和聚光镜之间放置1个起偏(振)镜,在物镜和目镜之间放置1个检偏(振)镜,并采用旋转载物台。调节起、检偏(振)镜的主截面使之互相垂直(正交位置),聚焦样品后,可在暗背景上显出双折射样品的明亮像。此外,利用各种补色器可以定量测定双折射的程度,进而推算出分子或颗粒在样品中排列的方向。

除上述列举的几种显微镜外,还发展了用远红外线作光源的显微镜,由于波长不受水的干扰,反差也好,不用染色即可观察活体标本。还有利用紫外线做光源的显微镜。另外根据显微镜的不同用途对其结构作适当的改变后,可形成许多其他类型,如比较显微镜、倒置显微镜、体视显微镜、毛细管显微镜以及离心显微镜等,其中倒置显微镜(inverted microscope)使用广泛。倒置显微镜与正置显微镜的区别在于镜体的光学组件排列对于物台而言是相反的:正置显微镜的聚光镜和光源在物台的下面,而倒置显微镜的聚光镜和光源在物台的上面;正置显微镜的物镜在物台的上面,而倒置显微镜的物镜在物台的下面。由于可以直接将培养细胞的瓶、皿放在倒置显微镜的物台上,所以一般在细胞培养室中放置1台配有相差装置的倒置显微镜,可随时观察细胞的培养情况。近年来还发展了更先进的激光扫描共焦显微镜和多光子激发荧光显微镜,简单介绍如下。

七、激光扫描共焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)

激光扫描共焦显微镜或称共焦扫描激光显微镜是20世纪80年代发展起来的新技术。这种技术不需烦琐的样品处理,而是巧妙地利用共焦光路和激光扫描技术获取生物

样品不同层面的图像(称为光切片),再通过计算机组合成三维重构的影像。

仪器的基本组件和功能如图 1-1-9 所示:高数值孔径的物镜、扫描器(其作用是驱使激光在样品焦平面上进行前后移动)、双色反射镜(使较长波长的光透过它,使较短波长的光反射到扫描器,作用是分离激发光和荧光)、1 个简单的消色差棱镜、针孔光阑和 1 个检测器(光电倍增管或者二极管矩阵),针孔光阑的中心孔点和激光经物镜在样品平面上的聚焦点在光学上是共轭的,即标本上某点的像呈现在针孔光阑处。

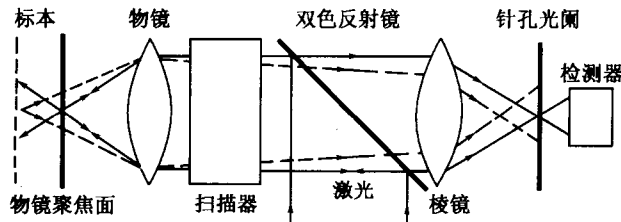


图 1-1-9 激光扫描共焦显微镜示意图

具体光路为:高能激光被 1 个双色反射镜反射后,进入 1 个扫描装置(是 1 个振动的反射镜或者是 1 个振动的晶体),它以光栅扫描的方式在样品的 X-Y 平面上扫描,扫描光线再通过 1 个高数值孔径的物镜,聚焦在 1 个样品点上,这是共焦显微镜的第 1 个焦点。由于使用 1 个高数值孔径的物镜,光以 1 个很大的角度到达样品,产生了 1 个很薄的焦面。激光在 1 个样品平面上扫描后,继而在 Z 轴方向移动 $1\ \mu\text{m}$ (可调节距离),再进行 X-Y 平面上的扫描,可将每一 X-Y 平面上的扫描看成 1 个光切片,将很多光切片集合起来,就可产生出 1 个三维物体的结构。激光激发样品发射出的荧光返回到物镜、扫描器和双色反射镜,到达 1 个消色差棱镜,由它聚焦到 1 个针孔光阑,这是共焦显微镜的第 2 个焦点,最后穿过针孔光阑的光被 1 个检测器收集,信号被处理后,形成 1 个扫描区的图像。计算机控制了所有的机械、电子操作以及图像的储存和处理。

由于针孔光阑起到空间滤波的作用,使样品焦面之上和之下发出的杂散光都被针孔光阑阻拦,所以分辨力可提高到 $30\ \text{nm}$,比一般显微镜分辨力的 $200\ \text{nm}$ 提高约 7 倍。可用于观察复杂生物样品的三维结构,如细胞质中的细胞骨架网络、细胞核中染色体等。

八、多光子荧光显微镜 (multiphoton fluorescence microscopy, MFM)

普通的荧光显微镜都是用单光子激发(如用 $360\ \text{nm}$ 的紫外光激发样品),而多光子荧光显微镜是用双光子或多光子同时激发样品(如用 2 个波长为 $1\ 000\ \text{nm}$ 的光子同时激发)使样品产生荧光。多光子荧光显微镜也称为多光子激发(multiphoton excitation, MPE)荧光显微镜。

其基本原理是:荧光物质的 1 个分子几乎同时吸收 2 个同一频率的光子(如果是双光子, $\omega_1 = \omega_2$),分子被激发至高能级,随即发生自发跃迁,辐射出一频率略小于 2 倍入射光频率的荧光分子(图 1-1-10)。

多光子荧光显微镜的构造与激光共焦扫描显微镜类似,由于不需要空间滤波,因此比激光扫描共焦显微镜减少了 1 个针孔光阑。与普通荧光显微镜和激光共焦显微镜相比较,多光子荧光显微镜成像有 2 个主要特点,这 2 个特点给生物学和医学样品的观察带来

很多优越性,简介如下:

第 1 个特点是:多光子激发光的使用频率低于单光子激发光的频率。这样在单光子激发时需要紫外光激发的染料,在多光子激发的情况下,只需红光、近红外光或是红外光的激发就可以了。其优越性在于:①由于红光、近红外光或是红外光的能量较低,减少了高能量的单光子紫外激发对生物样品的光分解作用,有利于更长时间地观察活细胞或活生物样品。②由于激发样品时产生的散射光与波长的 4 次方成反比,所以与普通荧光显微镜和激光共焦显微镜相比较,多光子激发造成的散射光要小得多,大大降低了散射光对测量的干扰,使激发光能大部分能到达样品焦平面,提高了穿透深度,而且还会使焦点处的激发光强增大,提高荧光光强。这在高散射活体测量时尤为重要。③多光子激发比单光子激发提高信噪比。第 2 个特点是: N 光子的激发几率与激发光强的 N 次方成正比(即发射荧光光强与激发光强的 N 次方成正比)。因此多光子激发过程只在焦点附近(焦点附近激光强,多光子同时被吸收)会大量激发染料,远离焦点的荧光光强会迅速降低,所以多光子技术可以避免过早地漂白非焦点区域的染料,从而可延长检测时间,有利于减少测量误差。

多光子荧光显微镜与激光共焦扫描显微镜相比较,虽然多光子荧光显微镜价格昂贵,但由于它的激发光波长长,对活细胞损伤小,光散射低、光漂白少,信噪比大,省去了针孔光阑的空间滤波,所以多光子激发荧光成像技术也逐渐被应用于生物学和医学研究领域,并发挥了显著作用。

参考文献

1. James J. Light microscopic techniques in biology and medicine. Amsterdam: Martinus Nuhoff Medical Division, 1976
2. 薛绍白,张鸿卿.中国大百科全书.生物学 1.光学显微镜(辞条).北京,上海:中国大百科全书出版社,1991
3. 谷祝平主编.光学显微镜.兰州:甘肃人民出版社,1985
4. 张鸿卿,连慕兰主编.细胞生物学实验方法与技术.北京:北京师范大学出版社,1992
5. 张启元等编.现代生物学实验技术.北京:北京师范大学出版社,1992
6. Hell S W. Nonlinear optical microscopy. Bioimaging, 1996, 4(3): 121 ~ 122
7. 汪堃仁,薛绍白,柳惠图主编.细胞生物学.第 2 版.北京:北京师范大学出版社,1998
8. 斯佩克特 D L,戈德曼 R D,莱因万德 L A,等.细胞实验指南.黄培堂,等译.北京:科学出版社,2001

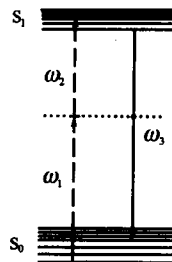


图 1-1-10
双光子激发原理