

现代生物学实验

(上册)

主编 林加涵 魏文铃 彭宣宪



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

现代生物学实验(上册)/林加涵,魏文铃,彭宣宪 主编. —北京:高等教育出版社;
海德堡:施普林格出版社,2000.12
ISBN 7-04-008697-2

I. 现… II. ①林…②魏…③彭… III. 生物学-实验 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 47680 号

责任编辑:吴雪梅 封面设计:张楠 责任印制:陈伟光

现代生物学实验(上册)

林加涵 魏文铃 彭宣宪 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>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京民族印刷厂

开 本 787×1092 1/16

版 次 2000 年 12 月第 1 版

印 张 15.75

印 次 2001 年 2 月第 1 次印刷

字 数 423 000

定 价 20.00 元

© China Higher Education Press Beijing and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000

版权所有 侵权必究

序

进入 21 世纪,生命科学将在社会进步、科学发展、经济繁荣和人民健康中起到更重要的作用。如何使培养出来的学生能较好地适应和满足这一需要,是摆在教育工作者面前的重要任务。厦门大学生命科学学院历来十分重视这一工作。《现代生物学实验》的编写就是其具体的体现。

《现代生物学实验》是厦门大学生命科学学院承担的教育部创名牌课程之一“现代生物学实验”的主要内容,是“面向二十一世纪生物学实验教学内容和教学体系改革”的具体实践。它较全面和系统地介绍了生物显微实验技术,生物无菌培养实验技术,生化样品的制备、分析与测试实验技术,基因工程实验技术。其实验内容和体系都有较大的创新,既系统阐述了实验的基本原理和基本技能,又反映了学科的发展前景,特别是汇集了近期较为新颖的技术方法,把经典的实验内容和前沿新技术有机地结合在一起。这样,提出了新的实验课程设计方案,改革了原有的实验教学方法和手段,增添了新的实验教学内容,建立了新的实验教学系统。所以,这是一本具有科学性、系统性、先进性和适用性的好教材。它将在促进生命科学实验教学的发展中起到积极的作用。

厦门大学生命科学学院其前身为厦门大学生物学系,长期以来形成了重视教学的良好风气。参加本书编写工作的人员均为来自教学第一线的具有丰富的教学工作经验的老师。他们或是从教 30 年以上的老一辈专家,或是具有博士学位的年轻学者。他们一起研讨、取长补短、反复酌量、精益求精。由此,不但形成了本书编写人员在教学经历、学术层次、年龄结构等诸方面合理安排的特点,而且反映了厦门大学生命科学学院的老专家关心青年教师成长,青年教师尊重老专家,老专家和青年教师热心教育事业的优良传统。

由此,乐而作序。书中的不足之处,还望同道不吝赐教。

唐崇惕

中国科学院院士

2000 年 7 月 14 日

前 言

当今,生命科学发展迅速,新技术、新方法层出不穷。为了适应学科发展的需要,厦门大学生命科学学院在“面向二十一世纪生物学实验教学内容和教学体系改革”具体实践的基础上,组织教师进行了《现代生物学实验》教材的编写。

《现代生物学实验》是我院承担的教育部创名牌课程之一“现代生物学实验”的主要内容。全书分上、下两册,较全面和系统地介绍了生物显微实验技术,生物无菌培养实验技术,生化样品的制备、分析与测试实验技术,基因工程实验技术。其实验内容和体系都有较大的创新,既系统阐述了实验的基本原理和基本技能,又反映了学科的发展前景,特别是汇集了近期较为新颖的技术方法,把经典的实验内容与前沿的新技术有机地结合在一起,改革了原有实验教学方法和体系,增添了新的实验教学内容,建立了新的教学系统。它将在促进生命科学实验教学的发展中起一定的作用。各院校和研究单位在教学中可根据自己的设备条件和专业需要,酌情择取。

本书大部分实验由我院生物学系林加涵、徐金森、陈美、谢宏、陈德海、黄跃坚、郑忠辉、许玉德、叶军、沈明山、陈清西、彭宣宪、杨盛昌、刘月英、周兴旺、刘仁海、石艳、周涵韬、章军、李雪松编写。并聘请浙江大学生命科学学院李凤玉编写部分实验。由于时间和水平的限制,书中难免存在不当与错误之处,恳请同行专家及广大读者批评斧正,以便再版时修改。

本书编写过程中,上册由杨汉金、魏文铃、赖垣忠、林秀敏、洪水根教授审阅,下册由许良树、陈素丽、楼士林教授、宋思杨副教授审阅。他们皆提出许多宝贵意见。在出版过程中,还得到了高等教育出版社林金安、吴雪梅同志的热心指导和帮助,得到了厦门大学校、院领导的大力支持。在此,谨向他们致以诚挚的谢意。

编 者

于厦门大学生命科学学院

2000年7月

目 录

第一篇 生物显微实验技术

第一章 各种光学显微镜

实验一	普通光学显微镜的使用(一)——细胞形态结构的观察	(2)
实验二	普通光学显微镜的使用(二)——细胞大小的测量	(7)
实验三	普通光学显微镜的使用(三)——生物显微绘图	(10)
实验四	普通光学显微镜的使用(四)——细胞计数	(12)
实验五	相差显微镜的使用——活细胞的相差显微镜观察	(13)
实验六	暗视野显微镜的使用——细胞的暗视野显微镜观察	(17)
实验七	荧光显微镜的使用——细胞的荧光显微镜观察	(20)
实验八	偏光显微镜的使用	(23)
实验九	干涉显微镜的使用——培养细胞的观测	(27)
实验十	微分干涉反差显微镜的使用——培养细胞的观察	(30)
实验十一	激光扫描共聚焦显微镜及其使用	(32)
实验十二	扫描隧道显微镜的原理及其应用	(35)
实验十三	电子显微镜在生物学研究中的应用——透射电镜细胞样品的制备和观察	(36)
实验十四	扫描电镜样品的制备——体外培养细胞的制备	(41)
实验十五	核小体电镜样品的制备与观察	(44)
实验十六	染色体的电镜制样和观察	(46)
实验十七	细胞冰冻蚀刻制样和观察	(49)
实验十八	胶体金免疫标记电镜技术	(53)
实验十九	电镜标本的负染色技术	(55)
实验二十	核酸电镜技术	(57)
实验二十一	电镜放射自显影技术	(59)
实验二十二	电镜酶细胞化学技术	(65)

第二章 生物显微制片技术

实验二十三	石蜡切片法(一)——取材、固定、洗涤、脱水	(70)
实验二十四	石蜡切片法(二)——透明、透蜡、包埋	(76)
实验二十五	石蜡切片法(三)——切片、贴片	(78)
实验二十六	石蜡切片法(四)——染色、封藏	(82)

II 目 录

实验二十七	石蜡切片法实例(一)细胞形态染色 I. 兔肝的制片 ——苏木精 - 伊红(简称 H.E)对染法	(87)
实验二十八	石蜡切片法实例(二)细胞形态染色 II. 根的制片——番红 - 固绿对染法	(89)
实验二十九	石蜡切片法实例(三)细胞化学染色 I. 核酸的显示方法——Feulgen 反应	(91)
实验三十	石蜡切片法实例(四)细胞化学染色 II. 糖类的显示方法——PAS 反应	(93)
实验三十一	石蜡切片法实例(五)细胞化学染色 III. 组蛋白的显示方法——碱性固绿法 ...	(96)
实验三十二	石蜡切片法实例(六)细胞化学染色 IV. 碱性磷酸酶的显示方法——钙钴法 ...	(97)
实验三十三	徒手切片法	(99)
实验三十四	木材切片法	(100)
实验三十五	火棉胶切片法	(102)
实验三十六	冰冻切片法	(103)
实验三十七	整体制片法	(105)
实验三十八	解离法	(106)
实验三十九	压片法(一)——果蝇幼虫唾液腺巨大染色体的制作	(108)
实验四十	压片法(二)——植物根尖染色体的制片	(109)
实验四十一	涂布法	(110)
实验四十二	磨片法	(111)

第三章 显微摄影术

实验四十三	OLYMPUS BH ₂ 系列显微镜与 PM - 10AD 摄影装置的使用	(113)
实验四十四	胶片的冲洗	(116)
实验四十五	印相和放大	(121)
实验四十六	黑白感光幻灯片制作技术	(122)
实验四十七	显微缩时电影术	(126)
实验四十八	NIKON 显微演示及图像分析系统	(127)

第二篇 生物无菌培养技术

第四章 微生物的培养和发酵

实验四十九	微生物培养基的配制	(131)
实验五十	高压蒸汽灭菌法与消毒方法	(133)
实验五十一	微生物接种技术	(136)
实验五十二	从土壤中分离和纯化微生物	(138)
实验五十三	真菌的组织块分离法	(140)
实验五十四	单孢子分离法	(141)
实验五十五	解酚菌的富集和筛选	(143)
实验五十六	稀有放线菌选择分离	(144)

实验五十七	厌氧菌的分离培养·····	(145)
实验五十八	污水中大肠菌群的计数——MPN 法 ·····	(147)
实验五十九	荧光显微镜直接计数法·····	(149)
实验六十	微生物的诱变选育·····	(150)
实验六十一	微生物菌种的保藏方法·····	(152)
实验六十二	斯达油脂酵母胞外多糖发酵·····	(154)
实验六十三	不同碳源对菊糖酶合成的影响·····	(156)
实验六十四	菊糖酶发酵培养基配方的正交试验·····	(158)
实验六十五	小型自控发酵罐菊糖酶发酵·····	(160)
实验六十六	5'-磷酸二酯酶的固体发酵·····	(163)

第五章 植物组织培养

实验六十七	植物的试管快速繁殖技术·····	(166)
实验六十八	茎尖脱毒技术·····	(168)
实验六十九	花药培养及单倍体育种·····	(170)
实验七十	植物细胞的悬浮培养·····	(172)
实验七十一	植物细胞突变体的筛选·····	(173)
实验七十二	植物细胞同步培养·····	(175)
实验七十三	细胞的连续发酵——人参细胞的工业化生产·····	(177)
实验七十四	原生质体的制备·····	(180)
实验七十五	原生质体的培养及植株再生·····	(181)
实验七十六	原生质体的融合技术·····	(183)
实验七十七	人工种子的制作·····	(185)
实验七十八	人工种子的保存和发芽·····	(186)
实验七十九	植物茎尖及分生组织的超低温保存——两步冰冻法·····	(187)
实验八十	培养细胞的超低温保存——玻璃化法·····	(189)

第六章 动物组织培养

实验八十一	组织块培养技术·····	(192)
实验八十二	分散细胞培养技术·····	(194)
实验八十三	贴附型细胞的传代培养·····	(197)
实验八十四	悬浮型细胞的传代培养·····	(199)
实验八十五	肿瘤细胞株的建立与鉴定·····	(200)
实验八十六	细胞的化学诱变与转化·····	(202)
实验八十七	器官培养技术·····	(204)
实验八十八	细胞克隆技术·····	(207)
实验八十九	动物细胞融合技术·····	(211)
实验九十	培养细胞生长曲线的绘制·····	(216)

IV 目 录

实验九十一	培养细胞分裂指数的测定·····	(218)
实验九十二	细胞集落形成率测定·····	(220)
实验九十三	培养细胞的显微注射法·····	(222)
实验九十四	细胞骨架和核骨架的显示、分离及观察 ·····	(225)
实验九十五	培养细胞的冻存与复苏·····	(228)
附 录	·····	(232)
主要参考文献	·····	(242)

第一篇 生物显微实验技术

第一章 各种光学显微镜 及电子显微镜在生物学中的应用

显微镜发明 300 多年来,通过不断地改进,它的装置和性能都得到不断改善,并且出现了适应于不同需要的各种特殊显微镜。如能观察活细胞的相差显微镜;既能作形态观察,又能作定性分析的荧光显微镜;作为定量研究的干涉显微镜;用于双折射研究的偏光显微镜;根据量子力学中的隧道效应设计而成,迅速提高生物大分子、超导材料及表面科学等领域研究水平的扫描隧道显微镜;20 世纪 80 年代发展起来的新一代科技产品,现代形态学、细胞分子生物学、遗传学、神经科学、药理学、材料学及地质学等领域中强有力的研究工具之一——激光扫描共聚焦显微镜等等。光学显微镜技术虽然是经典的技术,然而它还在不断发展之中,所以迄今仍是研究生物学和其他科学的重要手段。

光学显微镜分辨率由于受照明光线波长的限制,理论上其最小分辨距离为 $0.2\ \mu\text{m}$,实际上能清晰看到的最小物体直径约为 $0.5\ \mu\text{m}$ 大小。而电子束的波长很短,电子显微镜最小分辨距离可达到 $0.1\ \text{nm}(1\text{\AA})$,相当于原子的大小。所以,自从 1933 年世界上第一架电子显微镜问世之后,大大促进了生物的微观世界研究水平的提高。除了透射电镜之外,还发展了扫描电镜、高压电镜以及很多的衍生技术,如负染技术、胶体金免疫标记技术、大分子(核酸)电镜技术、复型和冷冻蚀刻技术、电镜放射自显影技术及电镜酶细胞化学技术等。这就推进了对细胞超微结构和分子结构的研究。

本章择要介绍各种光学显微镜和电镜技术的基本原理及其在生物学中的应用。

实验一 普通光学显微镜的使用(一)

——细胞形态结构的观察

一、实验原理

细胞是生物体的基本结构单位。构成生物机体的细胞是多种多样的。要对细胞进行研究,首先要从其形态结构入手。众所周知,细胞很小,绝大多数的细胞人们的肉眼无法辨认。所以,要借助显微镜的成像及放大原理,在显微镜下,特别是在电镜下才能观察到细胞的基本形态结构。

显微镜为什么能把微小的细胞或物体放大呢?在普通物理学中已经详细地谈到透镜成像的原理。这个原理也就是显微镜的光学原理。显微镜之所以能将被检物体进行放大,是通过透镜来实现的。虽然物镜和目镜的结构很复杂,但它们的作用都相当于一个凸透镜,其成像原理和光路图如图 1-1 所示。被检物 AB 放在物镜(O_1)下方的 $1\sim 2$ 倍焦距之间,则在物镜(O_1)后方形成一个倒立的放大实像 A_1B_1 ,这个实像正好位于目镜(O_2)的下焦点之内,通过目镜后形成一个放大的虚像 A_2B_2 ,这个虚像通过调焦装置使其落在眼睛明视距离处,即 25 cm ,使所看到的物体最清晰,也就是说虚像 A_2B_2 是在眼球晶状体的两倍焦距之处,在眼球后在视网膜形成一个倒立的 A_2B_2 缩小像 A_3B_3 。

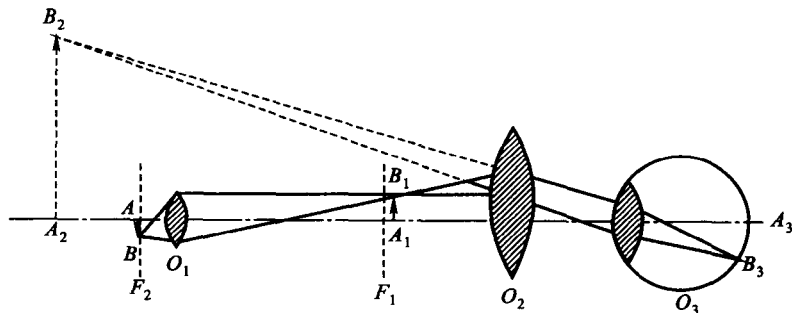


图 1-1 光学显微镜的放大原理和光路图

被检物体(AB)正好在物镜(O_1)的前焦点(F_1)之外($1\sim 2$ 倍焦距之间),中间像(A_1B_1)则正好在目镜(O_2)的焦点(F_1)之内,并形成正立放大虚像(A_2B_2)在眼球(O_3)的两倍焦距(F_2)之外,最终在视网膜上形成正实像

显微镜的照明原理:以透射光作为入射光,显微镜有两种照明方式,如图 1-2 所示。一种为临界照明,光源经扣光镜后会聚在被检物体上,光束狭而强,这是它的优点。但是光源的灯丝像与被检物体的平面重合,这样就造成被检物体的照明呈现出不均匀性,在有灯丝的部分则明亮,无灯丝的部分则暗淡,不仅影响成像的质量,更不适于显微照相。另一种为柯拉(Köhler)照明,照明光路中的光学组件包括光源、集光器、视场光栏、孔径光栏、聚光器和物台。在柯拉照明光路中,在集光器透镜两侧,灯丝和孔径光栏为一对共轭面。灯丝的像成在孔径光栏平面上。在聚光器透镜两侧,视场光栏和物台为一对共轭面,视场光栏的像呈现在物台上,因此,柯拉照明比临界照明优越。一是照明均匀,因为在标本平面上成像的是视场光栏,而不是灯丝;其二是通过调节视场光栏的大小

和位置可以控制标本平面上照明区的大小和位置。当只需要观察或测量标本的一部分时,可以关小视场光栏,减小照明区域,使标本的其他部分不受热,并且减少了杂散光的干扰。

显微镜的分辨率:也称为分辨力,它是指能把两个物点辨清的最小距离。能把两点分辨开的最小距离叫做分辨距离。分辨距离越少,则分辨率越高;分辨距离越大,则分辨率越低。所以,分辨率是以分辨距离来表示的,并与分辨距离成反比。显微镜的分辨率和物镜的镜口率,照明光线的波长有直接关系,其计算公式为:

$$D = 0.61\lambda / N.A. \quad N.A. = n \cdot \sin \alpha / 2$$

式中 D 为分辨率, λ 为光波波长, $N.A.$ 为物镜的数值孔径(镜口率), n 为物镜与标本间介质的折射率, $\sin \alpha / 2$ 为透镜视锥半顶角的正弦。目前,在实用范围内物镜的最大镜口率为 1.4, 可见光最短波长为 $0.4 \mu\text{m}$ 。

由此可见,光学显微镜最大的分辨率均为 $0.2 \mu\text{m}$,差不多等于可见光最短波长的一半。

由上式可知,要增加分辨率,需从缩短波长和增大镜口率着手。由于镜口率受介质折射率和视锥半顶角的限制,它的数值是有一定限度的,所以,只有缩短光的波长,才是最有效的办法。

放大率:也称放大倍数。显微镜的总放大倍数等于目镜和物镜的放大倍数的乘积。公式为:

$$M = K_1 \times K_2 = \frac{\Delta}{f_1} \times \frac{250}{f_2}$$

M 为总放大倍数,

K_1 为物镜放大倍数,

K_2 为目镜放大倍数,

Δ 为光学镜筒长(单位:mm),

f_1 为物镜焦距(单位:mm),

f_2 为目镜焦距(单位:mm),

250 为明视距离(单位:mm)。

由公式可知,物镜的放大率是对一定镜筒长度而定的,镜筒长度的变化,不仅放大率随之变化,而且成像也受到影响。因此使用显微镜时,不能任意改变镜筒的长度。所谓标准光学镜筒长是指物镜的后焦点与目镜的前焦点之间的距离。国际上将显微镜的标准镜筒长定为 160 mm,此数字标刻在物镜的外壳上。

焦点深度:显微镜调焦到看清楚标本的某一点时,不仅是这一物点,而且它的上下两侧也能看清楚,能看得清楚的这两侧的厚度叫做焦点深度。焦点深度可用如下公式表示:

$$T = \frac{Kn}{M \times N.A.}$$

K 为常数,约等于 0.24,

n 为被检标本周围介质的折射率,

M 为显微镜的总放大倍数,

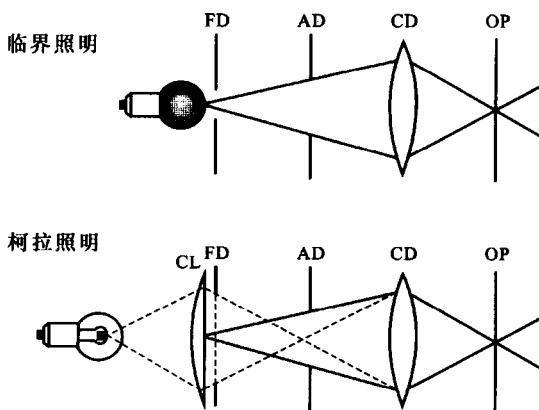


图 1-2 临界照明和柯拉照明

CL:集光器; FD:视场光栏; AD:孔径光栏;
CD:聚光器; OP:物台

$N.A.$ 为物镜的镜口率。

从上式可见焦点深度跟显微镜的总放大倍数及物镜镜口率成反比。因此,高放大率和高镜口率的显微镜其焦深就浅,不能看到标本的全厚度,必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。另外,被检物体周围介质(封片剂)的折射率加大可增大焦点深度。

镜像亮度和视场亮度: 镜像亮度是指在显微镜下所观察到的图像的明暗程度。镜像亮度与镜口率平方成正比,与总放大倍数成反比。即镜口率越大,镜像的亮度越大;总放大倍数越高,镜像亮度越小。视场亮度是指显微镜下整个视场的明暗程度。视场亮度不仅与目镜、物镜有关,而且还直接受聚光镜、光栏和光源等因素的影响。在不更换物镜和目镜的情况下,视场亮度大,镜像亮度也就大。使用时,对镜像亮度的要求,一般是使眼睛既不感到暗淡,又不耀眼为宜。

二、实验用品

(一)器材

显微镜,擦镜纸。

(二)试剂

香柏油或石蜡油,二甲苯。

(三)材料

兔肝细胞苏木精-伊红(H.E.)染色标本,念珠藻细胞玻片标本。

三、实验程序

(一)显微镜的使用

1. 观察前的准备工作

(1) 观察者要养成显微镜镜检的工作习惯,观察时要双眼同时睁开,一边观察一边进行记录或描绘。

(2) 观察时所用的材料、药品和各种器具要预先准备好。

(3) 显微镜在使用之前应检查一下它的各个部件是否完整和正常,并对载物台、目镜、物镜以及聚光器上端透镜进行必要的清洁工作。然后进行合轴调节,其操作步骤如下:

① 可变光栏的中心对准聚光镜的中心。如果可变光栏的水平是固定的,则装配时已保证它与聚光镜合轴,不必调整;如果可变光栏的水平位置可以移动,则应把可变光栏关到最小,使它的中心孔对准聚光镜下方的透镜中心。

② 载物台上放置观察标本,把聚光器上升到它上端透镜平面稍低于载物台平面的高度,并将它的可变光栏开到最大,用低倍物镜,进行调焦到能看见标本,可调反射镜使视野得到最亮和最均匀的照明,或把光栏关小,最亮的照明区正处在视野的中央。

③ 转到高倍镜,并调焦到看清标本,然后去掉标本,拔出目镜,眼睛直接向镜筒观察,并把可变光栏关小,看其亮点是否在视野中心,如果不是,就要转动聚光器的调节螺旋,把亮点调到视野中央,再慢慢开启可变光栏,使视野看到光栏边缘和聚光镜的边缘相接为止。

2. 显微镜的照明操作

(1) 当用天然光、日光灯及其他各种没有聚会透镜及光栏的显微镜灯或普通台灯照明时,因射来的光束宽,也比较均匀,操作比较简单,其步骤是:

① 先使显微镜正对光源,让反射镜镜面充分接受射来的光,把聚光器上升到它上端透镜平面稍

低于载物台平面的高度。

②将低倍物镜转到工作位置上,在载物台上放一标本片,把聚光器下的可变光栏开到最大,调节反射镜,使光线透过标本进入物镜。

③调焦到能看清标本,去掉标本后,再仔细调节反射镜,使视野得到最亮和均匀的照明,或照明最亮的区域正处在视野中央,然后进行其他操作步骤。

(2)当使用带有会聚透镜和可变光栏的显微镜灯时,虽然也可以照上述方法取得一般照明的效果,但要得到均匀而较强的照明,则应采用柯拉照明法。

一般显微镜的光源装置在镜座中,开启光源开关,把灯光亮度调到3~4档(或3 V)即可。

3. 聚光器和物镜配合的操作及滤光片的选择

(1)聚光器与物镜不但其性能要相匹配,而且两者的数值孔径要相一致。在完成上述照明操作之后,对无标明数值孔径的聚光器,先取下目镜,直接向镜筒中看,把聚光器下的可变光栏关到最小,然后才慢慢开大,让它的口径与视场的直径恰好一样大。最后安上目镜选用适当的滤光片,即可进行观察。每转换另一物镜,都要随着进行一次这样的配合操作。如果聚光器上有数值孔径的话,应根据所用物镜的数值孔径值作相应的调整,使两者的孔径数值一致。

(2)滤光片的选用:根据观察的目的要求,采用合适的滤光片,有如下选择:

①防止耀眼和减轻眼睛疲劳。当光线太强耀眼难受时,单为了削减入射光,可采用乳白玻璃或白色毛玻璃滤光片。最好根据标本染色的情况,选用一个绿色,黄绿色或蓝绿色的滤光片,把能刺激眼睛的红光吸收掉,以减轻眼睛的疲劳。

②增进分辨率。根据显微镜分辨率的原理可将白光中波长较长的光波吸收掉,而利用所通过的较短波长来照明,可以达到增进分辨率的目的。例如用一个绿色或蓝色的滤光片就可以达到目的。

③增大明暗反差。当需要利用标本的反差来识别其结构时,就要通过合适的照明来加强反差,其方法是选用一个颜色与标本颜色互补的滤光片。各种颜色互补色可见表1-1。

表1-1 各种颜色光的波长及其互补色

颜 色	波长/nm	互 补 色
紫	380~430	黄
蓝	430~490	
青	490~510	橙
绿	510~570	红
		紫红
黄	570~600	紫蓝
橙	600~620	青
红	620~750	

4. 观察操作

在完成上述各步的操作之后,便可在载物台上放上待检的标本片,进行调焦和观察。

(1)低倍、高倍镜的使用:先把低倍的物镜用粗调焦螺旋下降至离盖玻片0.5 cm处,然后一边观察视野一边上升物镜,直至看到图像,再将标本移到视野中心,用细调焦螺旋把物镜调至最清晰处,若要用高倍镜观察时,把所要进一步放大观察的部位移至视野中央,直接顺时针转换成高倍物

镜,然后用细调焦螺旋调焦,至看清物像。

(2)油镜的使用:先用低倍物镜观察标本的概况,然后更换高倍镜,并把需要用油镜观察的部位移到视野的正中央,再进行油镜观察操作:

①把镜筒向上提升约 1.5 cm(有的是载物台向下降 1.5 cm),再把油镜转到工作位置。

②在聚光器和盖玻片上所要观察的位置各滴一小滴香柏油或石蜡油,一边从侧面观察油镜头,一边细心拧动粗调焦螺旋,使油镜头的前端与油滴接触,再慢慢下降油镜,使其前端接近而没有碰到盖玻片为止,最后,一边观察视野中的图像,一边拧动细调焦螺旋,使镜筒稍为上下升降看清标本。

③观察完毕后,提升物镜约 1 cm,把油镜转离光轴,及时做清洁工作。油镜先用干的擦镜纸擦 1~2 次,把部分油去掉,再用清洁剂(70%乙醚+30%无水乙醇)或二甲苯滴湿的擦镜纸擦 2 次,最后用干擦镜纸擦 1 次。擦拭要小心,动作要轻,聚光器上的油滴也用同样方法处理。擦拭时,要顺镜头的直径方向,而不要沿镜头的圆周擦,载玻片上的油可用“拉纸法”擦净,即把一小张擦镜纸盖在载玻片上,在纸上滴一些清洁剂或二甲苯,趁湿把纸往外拉,这样连续作了 3~4 次,即可干净。最后,把聚光器下降约 1 cm,把物镜转离光轴,使镜筒下端正处在两个物镜之间,置于阴凉处保存。

(二)Olympus 显微镜观察的顺序操作(以 BHS 为例,图 1-3)

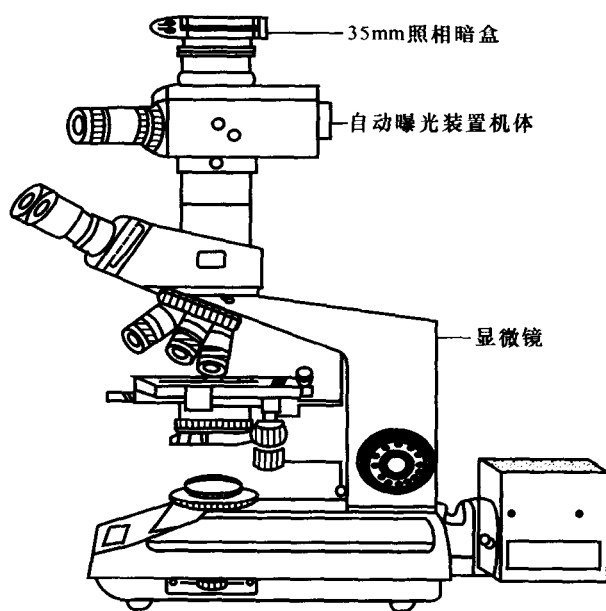


图 1-3 Olympus 显微镜(BHS 型)

1. 将电源开关置于 ON 的位置。
2. 电压调至 7~9 V。
3. 将 LBD-2 滤色镜放入灯室的窗口,根据亮度选用适当的 ND 滤色镜放入灯架一侧。
4. 把标本放在载物台上。
5. 用物镜(10×)对准焦点。
6. 调节双目镜筒的间距,以适合观察者眼瞳,同时调整两眼的屈光度。
7. 缩小视场光栏(约视场的 1/3)。

8. 将聚光镜上下移动调节,对准视场光束焦点。
9. 用两个调整螺杆把聚光镜的中心调整到视场的中心。
10. 把视场光栏调整到与目镜的视场外接处的附近。
11. 使用低倍镜,转动载物台的移动标尺,找出标本观察的位置。
12. 如果已找到观察位置,则更换物镜(高倍镜或油镜),按所要求的放大倍数进行观察。

(三)细胞形态结构观察

1. 兔肝细胞苏木精-伊红(H.E.)染色玻片标本的观察

先在干燥系物镜下观察肝小叶的概况,辨认肝细胞,然后用油镜仔细观察肝细胞的显微结构。注意肝细胞的形状,细胞核和核仁的形状和数量,细胞核和细胞质的染色区别等。

2. 念珠藻(*Nostoc communae*)细胞玻片标本的示范观察

念珠藻是由球形细胞粘成长链的丝状体,在丝状体细胞中,某些部位能看到比较大的透明的异形细胞,这些细胞具有固氮能力,并能由此处使丝状体断裂。由于念珠藻是原核生物,所以在油镜下看不到细胞核。

四、作业

1. 简述显微镜的原理及使用的一般步骤,特别注意说明油镜的作用。
2. 描绘一个兔肝细胞的基本形态结构。

(林加涵)

实验二 普通光学显微镜的使用(二) ——细胞大小的测量

一、实验原理

应用显微镜的成像原理,同时借助显微镜的镜台测微尺和目镜测微尺,两尺配合使用,进行测量和运算,得出细胞的大小。

镜台测微尺(stage micrometer)系一特制的载玻片(图 1-4),它在中央具有刻度的标尺,全长为 1 mm,共划分为 10 大格,每一大格又分成 10 小格,每一小格长 0.01 mm,即 10 μm 。也有全长为 2 mm,共分 200 小格,每小格长度不变。在标尺的外围有一小黑环,以便找到标尺的位置。

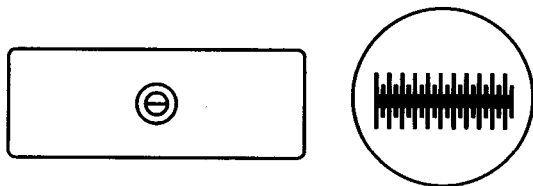


图 1-4 镜台测微尺

目镜测微尺(ocular micrometer)是放在目镜内的一种标尺,它有固定式和移动式两种类型。固定式目镜测微尺为一块圆形玻璃片,直径为 20~21 mm,如图 1-5 所示。在它的上面刻有各种形式的标尺,有为直线式的(图 1-5A),有为网式的(图 1-5B)。通常用以测量长度的标尺为直线式的,一般为 5 mm,分成 5 大格,每一大格分成 10 小格,共计 50 小格。也有用同样长度分为 100 小格的。网式目镜测微尺主要用以计算数目和测量物体的面积。在它上面刻有方格的网状标尺。方格的大小和数目各有不同,有 25、36 和 49 格,也有一个正方形大格中划分 100 个方格,在中央的一个方格中再划分 25 个小方格。

移动式目镜测微尺基本上和直线式目镜测微尺相似,所不同的是除了这种固定的标尺外,还有可以移动位置的指示线。它装在一个特别的目镜中,右边由一个能旋转的小轮控制着,轮上有刻度,分成 100 格,该轮每旋转一圈,目镜内能移动的指示线就从标尺一端向另一端移动一格(图 1-5C、D)。

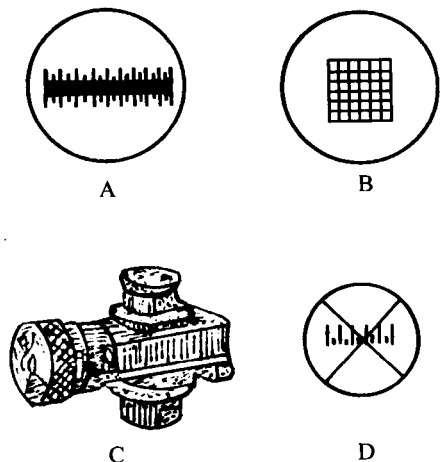


图 1-5 目镜测微尺

A. 直线式; B. 网式;
C. 移动式(外形); D. 移动式(内部)

显微测量时,先用镜台测微尺标定目镜测微尺每小格代表的长度,然后才能用目镜测微尺来测量细胞的长度。

二、实验用品

(一)器材

光学显微镜,镜台测微尺,目镜测微尺,载玻片,盖玻片,镊子,吸水纸。

(二)试剂

生理盐水,蒸馏水,0.2%次甲基蓝染液,瑞氏-吉姆萨染液,二甲苯。

(三)材料

蟾蜍表皮细胞悬液,小白鼠血涂片。

三、实验程序

(一)测微尺的使用操作

1. 卸下目镜的上透镜,将目镜测微尺有刻度一面向下装在目镜镜面上,再旋上目镜的上透镜。
2. 将镜台测微尺有刻度一面朝上放在载物台上夹好,使测微尺刻度位于视野中央。调焦至能看清镜台测微尺的刻度。
3. 小心移动镜台测微尺和目镜测微尺(如目镜测微尺刻度模糊,可转动目镜上透镜进行调焦),使两尺左边的“O”点一直线重合,然后由左向右找出两尺另一次重复的直线(图 1-6)。
4. 记录两条重合线间目镜测微尺和镜台测微尺的格数。按下式计算目镜测微尺每格的长度等于多少 μm

$$\text{目镜测微尺每格的长度 } / \mu\text{m} = \frac{\text{镜台测微尺的格数}}{\text{目镜测微尺的格数}} \times 10$$

例如,图 1-6 中,在低倍镜下所标定的目镜测微尺的全长(50 格),等于镜台测微尺 68 格,则

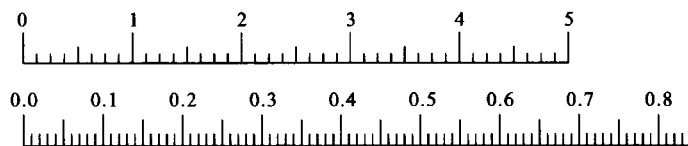


图 1-6 目镜测微尺的标定
上,目镜测微尺; 下,镜台测微尺

目镜测微尺每小格代表的长度则为:

$$\text{目镜测微尺每格的长度}/\mu\text{m} = \frac{55}{40} \times 10 = 13.75$$

5. 取下镜台测微尺,换上需要测量的玻片标本,用目镜测微尺的刻度测量细胞长度的格数,再乘以每格的 μm 数,即为细胞的实际长度。

如果用不同倍数的物镜与目镜时,就需重新计算,方法同前。

在测量时应注意将被测量的标本移放到视野中心,因为在这个位置上镜像最清晰,像差也最小,为减少误差,在测量同一被检物时,要量 3 次以上,采用其平均值,还需注意视野中的亮度应均匀一致,以免标尺分度左右两侧的亮度不同而影响准确测量值的得出。

根据长度测量结果可计算各种细胞、细胞核的体积及核质的比例。公式如下:

$$\text{椭圆形 } V = \frac{4}{3} \pi a b^2 \quad (a, b \text{ 为长短半径})$$

$$\text{圆球型 } V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (r \text{ 为半径})$$

$$\text{核质比例 } NP = \frac{V_n}{V_c - V_n} \quad (V_n \text{ 为核的体积}, V_c \text{ 为细胞的体积})$$

(二)几种细胞的观察测量

1. 蟾蜍扁平上皮细胞

用蟾蜍表皮细胞悬液制成临时装片,以 0.2% 次甲基蓝染液染色。先在低倍镜下观察,可见视野中有许多被染成蓝色紧密排列成片的多角形细胞,即蟾蜍皮肤的扁平上皮细胞。然后用测微尺测量细胞及细胞核的大小。

2. 小白鼠血细胞

将已制备好的小白鼠血涂片放在染色盘架上,滴数滴瑞氏-吉姆萨染液于涂片上,染液量以能遮盖欲染的血膜部分为限。静置染色 1 min 后,滴加等量 1/15 mol/L 磷酸缓冲液,用牙签轻轻搅动液体,使其与染液充分混匀,再静置染色 5~10 min(室温高时时间缩短),最后用清水缓缓冲洗 1 min,倾斜放置,凉干后进行观察测量。

先在低倍镜下观察血细胞的形态,再在高倍镜下仔细观察,可见视野中大多数细胞为双盘状,被染成粉红色或桔黄色,无细胞核,这些是红细胞(哺乳动物成熟红细胞是无核的)。散在红细胞间有少量不同类型的白细胞,其核被染成紫色,形状不一,不同类型的白细胞胞质中有不同颜色的颗粒分布。最后测量红细胞的直径长度。

四、作业

1. 低倍镜下:目镜测微尺_____格 = 镜台测微尺_____格,目镜测微尺每小格 = _____ μm ;