



PUTONG SHENGWUXUE SHIYAN

普通 生物学实验

彭玲 主编

华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

普通生物学实验

主 编 彭 玲

副主编 焦 莉

王亚芬

华中科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

普通生物学实验/彭 玲 主编

武汉:华中科技大学出版社,2006年10月

ISBN 7-5609-3857-4

I. 普…

II. ①彭… ②焦… ③王…

III. 普通生物学-高等学校-教材

IV. Q1

普通生物学实验

彭 玲 主编

责任编辑:叶 兰

封面设计:潘 群

责任校对:陈 骏

责任监印:张正林

出版发行:华中科技大学出版社

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:武汉万卷鸿图科技有限公司

印 刷:华中科技大学印刷厂

开本:787×1092 1/16

印张:12.25

字数:267 000

版次:2006年10月第1版

印次:2006年10月第1次印刷

定价:23.00元

ISBN 7-5609-3857-4/Q·22

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本书详细介绍了生物学实验中的基础理论和方法，主要包括显微镜技术、显微制片技术、细胞学基础实验技术、动植物标本的采集和制作、动植物组织学实验、动物解剖学实验等方面的内容。本书既有基础的生物学实验，又涉及现代生物学实验技术，内容新颖，涉及面广。本书可作为综合性大学生物工程、生物技术专业本科生的教材，也可供有关的科研人员参考。

前 言

近几年来,生命科学研究突飞猛进,生物学实验技术也有了很大的进步,各类相关学科的著作层出不穷。但是,一直以来,普通生物学的实验教材却没有太大的改变,还是沿用 20 世纪八九十年代的内容,不能反映最新的生物学技术。另外,生物学实验教学大纲也受到越来越多的冲击。一方面是生物学基础知识不断地快速扩张,使得现有的教学大纲不能满足大学早期阶段学生的需求。由于高中生物的重大改革,使得现在进入大学早期阶段的学生已具有较强的生物学基础知识和实验动手能力,大纲上的部分实验内容在高中阶段已经完成,不需要再重复。另一方面主要是生物学和其他相关课程之间的衔接,现代生物学的分支越来越细,许多实验技术在分支学科中重点介绍。因此,普通生物学实验和相关学科实验之间的内容也应该重新分配。

鉴于以上诸多因素,编写一本适合目前综合性大学生物工程、生物技术类专业的普通生物学实验教材已迫在眉睫。武汉生物工程学院自 1994 年建校以来,一直开设“普通生物学实验”这门课程,历经 12 年的教学和科研实践,积累了丰富的经验。因此,特组织我院生物技术系基础生物学教研组的骨干教师,共同来编写《普通生物学实验》这本教材,以期更好地展现生物学实验技术。

本书旨在为学生和教师在实验前后或实验过程中提供帮助。其内容重在基础生物学实验技术,除了一部分可以让学生在课堂上完成的基础实验外,还增设了相当一部分选做实验和阅读的内容。一方面保证基本实验技能的提高,另一方面可加深学生对生物学实验技术的了解,提高对下一阶段学习的兴趣。

本书在编写过程中,得到了武汉大学利容千、彭银祥和刘隆炎三位教授的大力支持和指导,在此表示衷心的感谢!

由于作者水平有限,不足之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

编者

2006 年 3 月

目 录

第 1 章 显微镜技术	(1)
1.1 普通光学显微镜	(1)
1.2 荧光显微镜	(12)
1.3 透射电子显微镜	(14)
1.4 扫描电子显微镜	(20)
1.5 扫描隧道显微镜	(24)
1.6 电子显微术在生命科学中的应用实例	(26)
第 2 章 显微制片技术	(28)
2.1 动植物组织制片技术	(28)
2.2 超薄切片技术	(35)
2.3 负染色技术	(45)
2.4 显微放射自显影技术	(47)
2.5 扫描电镜样品制备技术	(52)
2.6 石蜡切片法实例 细胞形态染色: 兔肝的制片—— 苏木精-伊红 (简称 HE) 对染法	(56)
第 3 章 细胞学基础实验	(59)
3.1 细胞的形态与结构	(59)
3.2 细胞的有丝分裂	(62)
3.3 叶绿体的分离与荧光观察	(65)
3.4 联会复合体的染色与观察	(68)
3.5 细胞骨架的显示与观察	(70)
3.6 血细胞的观察与计数	(74)
第 4 章 动植物学基础实验	(78)
4.1 动植物标本的采集与鉴定	(78)
4.2 植物组织	(85)
4.3 植物根、茎、叶的形态与结构观察	(92)
4.4 植物的繁殖器官	(105)
4.5 植物气孔的比较观察和蒸腾速度的测定	(111)
4.6 动物组织	(113)
4.7 ABO 血型鉴定	(127)
4.8 人体动脉血压的测定	(129)
第 5 章 动物解剖学实验	(131)
5.1 解剖的目的与操作	(131)

5.2 无脊椎动物蝗虫的解剖·····	(132)
5.3 鲤鱼(或鲫鱼)的解剖·····	(140)
5.4 家鸽的解剖·····	(147)
5.5 两栖动物牛蛙(或蟾蜍)的解剖·····	(156)
5.6 哺乳动物家兔的解剖·····	(164)
附录·····	(176)
附录一 实验室规则·····	(176)
附录二 玻璃仪器的洗涤和各种洗液的配制·····	(176)
附录三 常用生物染料的主要性质和配制·····	(178)
附录四 实验报告的书写·····	(182)
参考文献·····	(186)

第1章 显微镜技术

1.1 普通光学显微镜

一、目的要求

了解普通光学显微镜的构造和各部分的性能，学习并掌握正确的使用技术。

二、材料和用品

生物切片标本、显微镜、二甲苯、香柏油。

三、方法和步骤

(一) 了解显微镜的构造和性能

光学显微镜是研究生物学的常用工具，由一组光学放大系统和支持及调节它的机械系统组成，有的还带有光源部分。其结构见图 1.1.1。

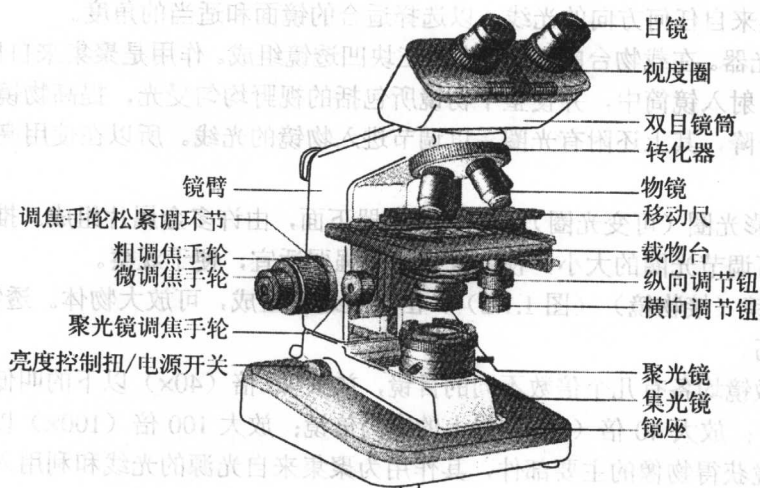


图1.1.1 光学显微镜的结构

1. 机械系统

(1) 镜座和镜柱。镜座是显微镜底部的承重部分，它使显微镜重心较低，不致倾倒。其上直立的短柱部分为镜柱，支持镜臂和镜台。

(2) 镜台。又名载物台，是放置玻片标本的平板。其中央有一圆孔，称镜台孔，以便从下方来的光线由此通过。镜台上有压片夹用以固定标本。较好的显微镜装有标本移动器（或称推进尺），既可固定载玻片，又可转动螺旋前后左右移动标本。有的标本移动器上还带有标尺，可利用标尺上的刻度寻找所要观察的标本位置。

(3) 镜臂。为镜柱之上弯曲的部分，以便于持握。有些老式显微镜的镜臂与镜柱之间有一个能活动的倾斜关节，可使镜身向前后倾斜，便于观察。新式显微镜的镜筒已是倾斜的，而且能转动，没有倾斜关节。

(4) 镜筒。为镜臂上端的圆筒部分。其顶端安置目镜，下端连接镜头和转换器。由物镜到目镜的光线由此通过。

(5) 镜头转换器。是镜筒下端一个可旋转的圆盘。其上可装置数个物镜，以便观察时换用不同倍数的物镜。

(6) 调焦螺旋。有粗调节器和细调节器，能使镜筒或镜台升降，调节物镜和观察材料间的距离，以求得清晰的图像。粗调节器升降镜筒的距离较大，约为 50 mm，主要用于寻找目的物。由低倍镜观察标本时，用粗调节器调焦距。细调节器升降的幅度较小，为 1.8~2.2 mm，能精确地对准焦点，取得更清晰的物像。使用时，一般拧动不超过一圈。由低倍镜转高倍镜观察时，则用细调节器调焦。调焦螺旋是显微镜上的一个重要装置，因为对不准焦距就看不清被观察的物体。

2. 光学系统

光学系统包括照明系统和成像系统。前者由反光镜、聚光器和虹彩光圈组成。后者由物镜和目镜组成。

(1) 反光镜。为一圆形的平、凹双面镜，位于显微镜的下方，接受外来光线，将光线反射到聚光器。平面镜反光较弱，用于光线较强的情况下。凹面镜的方向可以任意转动调节，便于收集来自任何方向的光线，以选择适合的镜面和适当的角度。

(2) 聚光器。在载物台的下面，由两三块凹透镜组成。作用是聚集来自反光镜的光线，使光线增强，射入镜筒中，并使整个物镜所包括的视野均匀受光，提高物镜的鉴别能力。聚光器可以升降，其上还附有光圈，以调节进入物镜的光线。所以在使用高倍镜时，必须配以聚光器。

(3) 虹彩光圈（可变光圈）。位于聚光器下面，由许多金属片组成。推动操纵光圈的调节杆，就可调节光圈的大小，使上行光线的强弱适宜，便于观察。

(4) 物镜（接物镜）（图 1.1.2）。由数组透镜组成，可放大物体。透镜的直径越小，放大倍数越高。

每架显微镜均备有几个倍数不同的目镜，放大 40 倍（40×）以下的叫低倍镜，一般为 10 倍（10×）；放大 40 倍（40×）以上的叫高倍镜；放大 100 倍（100×）以上的叫油镜。物镜是显微镜获得物像的主要部件，其作用为聚集来自光源的光线和利用入射光对被观察的物体作第一次放大。

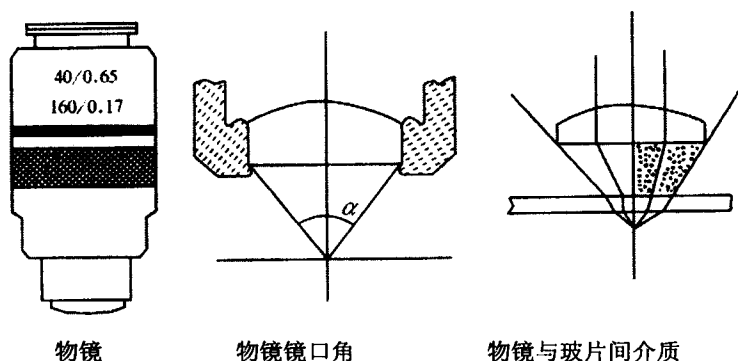


图1.1.2 物镜

每个物镜上通常标有表示物镜主要性能的参数。如 10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17, 10 为物镜的放大倍数, 即 10 $\times$, 0.25 为数值孔径 ($N\cdot A$), 160 为镜筒长度 (160 mm), 0.17 为所要求的盖玻片厚度 (称为镜口角) 的一半正弦值和玻片与物镜间介质的折射率的乘积, 可用以下公式表示, 即

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

式中, n 表示介质的折射率; α 表示最大入射角的半数, 即镜孔角的半数。

因此, 光线投射到物镜的角度愈大, 显微镜的效能就愈大, 该角度的大小取决于物镜的直径和焦距。

显微镜的分辨力是指显微镜能够辨别两点之间最小距离的能力。它与物镜的数值孔径成正比, 与光波长度成反比, 因此, 物镜的数值孔径愈大, 光波长度愈短, 则显微镜的分辨力愈大, 被检物体的细微结构也愈能区别。一个高的分辨力意味着一个小的分辨距离, 二者成反比关系。

能辨别两点之间的最小距离 = $1/2$ 光波长度 / 数值孔径

人们肉眼所能感受的光波平均长度为 0.55 μm , 假如用数值孔径为 0.65 的物镜 (高倍镜), 它可分辨的两点之间的最小距离为 0.42 μm , 而两点距离在 0.42 μm 以下的就分辨不出, 即便使用倍数更高的物镜, 增加显微镜的总放大率, 也仍然分辨不出。只有改用数值孔径更大的物镜, 增加其分辨力才行。所以, 显微镜的放大倍数与其分辨力是有区别的。

油镜镜头的焦距短、镜口角小, 因而其数值孔径愈高, 光波就愈短, 则所能辨析的物体愈小。另外, 滴香柏油作为介质使用时, 物镜与载玻片之间仅隔一层油性物质 (其他的物镜与载玻片之间隔着一层空气)。由于香柏油的折射率等于 1.52, 与玻璃相同, 所以当光线通过载玻片后, 可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射, 可使视野光线充足。相反, 玻片与物镜之间的介质为空气时, 当光线通过玻片后, 受到折射, 发生散射现象, 进入物镜的光线显然减少, 这样就降低了视野的照明度, 影响分辨力。

(5) 目镜 (接目镜)。是一个金属的圆筒, 上端装有一块较小的透镜, 下端装有一块较大的透镜, 其作用是将物镜所放大和鉴别了的物像进行再放大。目镜内可附加指针和测微尺。每架显微镜常备有几个倍数不同的目镜, 其上也刻有 5 $\times$ 、10 $\times$ 、12.5 $\times$ 等放大倍数, 显微镜的放大倍数即是所用目镜的放大倍数和所用物镜的放大倍数的乘积。

（二）了解显微镜的成像原理

光学显微镜是利用光学的成像原理，观察生物体的结构。首先利用反光镜将可见光反射到聚光器中，把光线汇聚成束，穿过生物制片（观察），进入接物镜的透镜上。因此所观察的制片都要很薄（一般为 $8\sim 10\mu\text{m}$ ），光线才能够穿透制片，经过接物镜将制片上的结构放大为倒立的实像。这一倒立的实像经过目镜的放大，映入眼球，成为放大的倒立的虚像。显微镜的成像原理如图 1.1.3 所示。

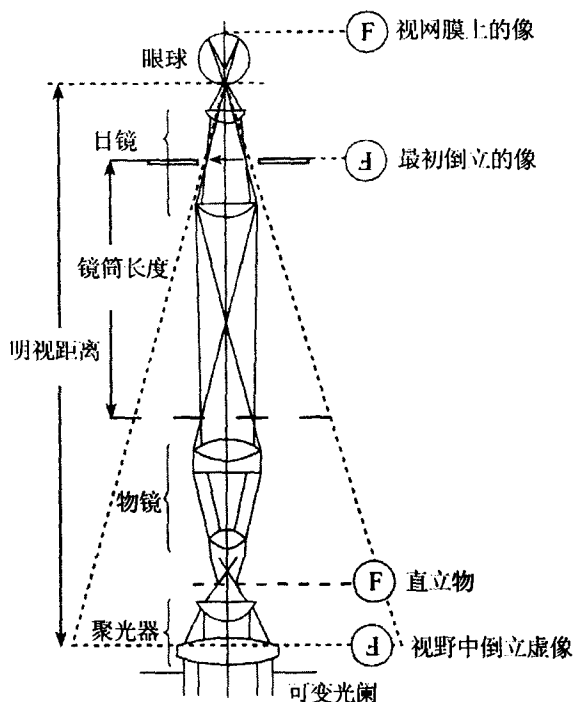


图1.1.3 显微镜成像原理

（三）显微镜的使用方法

1. 安放显微镜

打开镜箱，右手紧握镜臂，左手平托镜座，将显微镜轻放在桌上，使镜臂正对自己的左胸、距离桌子边缘几厘米处。

2. 检查

检查各部分部件是否完好，镜身、镜头必须清洁。

3. 对光

显微镜的光源一般用天然光源，也可用日光灯或显微镜灯，但不能用直射日光。因直射日光会影响图像的清晰，损坏光源装置和镜头，而且刺伤眼睛。对光时，首先将光圈的孔径调至最大，将镜筒升到最高点，再将低倍镜对准镜台孔，镜头离载物台约有 1 cm 。这时，一边把反光镜转向光源，一边用左眼（两眼睁开）从目镜中观察，光线过强时宜用平面镜，光线过弱时宜用凹面镜。对好光后不要再移动显微镜，否则又需要重新对光。

此外,在镜检全过程中,根据所需光线的强弱,还可通过扩大或缩小光圈、升降聚光器和旋转反光镜以调节之。

4. 调焦

对好光后,就可将制片放在载物台上,有盖片的一面朝上,被检物体对准圆孔正中,用压夹压紧,或用标本移动器卡紧,开始调焦。先用低倍镜观察,因为低倍镜视野范围较大,易于全面地观察材料和寻找材料中需要重点观察的部分。转动粗调节器,使镜筒缓缓下降,这时必须由侧面仔细观察,右眼也要睁开。这样,不仅便于绘图,而且眼睛也不易疲劳。同时转动粗调节器,使镜筒缓缓上升(注意:拧动调节器的方向时切勿弄错,以免接物镜与载玻片碰撞,否则,既压碎玻片又损坏镜头),直至看清标本物像。然后,再轻轻转动细调节器,以便得到更清晰的物像。

5. 低倍镜观察

低倍镜下调焦距找物像时,若被检物体不在中央,可用标本移动器略微移动玻片,使接物像恰好位于视野中央。若光线不适,可拨动虹彩光圈的操纵杆,调节光线,使物像最清晰为止。

6. 高倍镜观察

推动转换器,将高倍物镜头转至镜筒正下方(转换时切勿动调节器)。这时,只要将细调节器向逆时针方向轻轻转动,就可看清楚目的物。注意:此时不可用粗调节器,否则会压碎玻片损伤镜头。由于显微镜所观察的生物材料是立体的,故在观察时必须随时转动细调节器,才能了解不同光学平面的情况。

在高倍镜下,将制片中的被检物按从上到下、从左到右的顺序移动,观察一遍。再换成低倍镜观察,然后转回高倍镜,如此反复观察几次,以熟练高倍镜的使用。用高倍镜观察蚕豆叶下表皮和小麦叶下表皮分别如图 1.1.4 和图 1.1.5 所示。

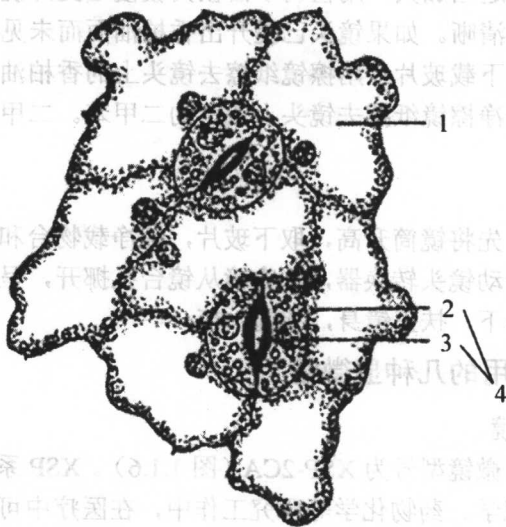


图1.1.4 蚕豆叶下表皮

1. 表皮细胞 2. 保卫细胞 3. 气孔 4. 气孔器

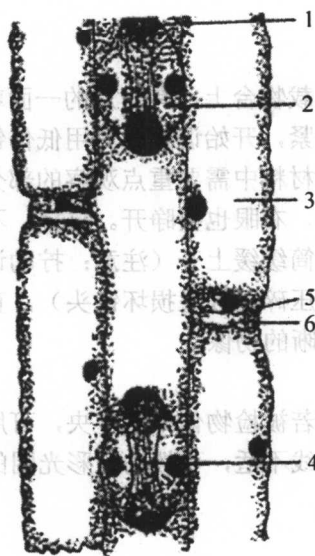


图1.1.5 小麦叶下表皮

1. 保卫细胞 2. 副卫细胞 3. 表皮细胞 4. 气孔 5. 栓细胞 6. 硅细胞

7. 油镜观察

用粗调节器将镜筒拉起 1.5~2 cm, 将油镜镜头转至镜筒下方。滴加一滴香柏油与载玻片相接触, 但注意不能相碰, 以免压碎玻片和损伤镜头。然后从接目镜中观察, 首先调节光圈与聚光器, 使光亮适当加大, 用粗调节器极其缓慢地提升镜筒, 直至出现物像为止。再用细调节器调至物像清晰。如果镜头已提升出香柏油面而未见物像时, 应按上述过程重复操作。使用完毕, 取下载玻片, 用擦镜纸擦去镜头上的香柏油, 再用擦镜纸蘸取少量二甲苯擦镜头, 然后用干净擦镜纸擦去镜头上残留的二甲苯。二甲苯用量不宜过多, 擦拭时间应短。

8. 复原

显微镜使用完毕, 先将镜筒升高, 取下载玻片, 擦净载物台和物镜, 将各部分还原, 反光镜垂直于镜座, 再转动镜头转换器, 将物镜从镜台孔挪开, 呈八字形, 并将镜筒降至最低处, 同时把聚光镜降下, 扶正镜身, 装镜入箱。

(四) 实验室常用的几种显微镜

1. 双目生物显微镜

常用的双目生物显微镜型号为 XSP-2CA (图 1.1.6)。XSP 系列生物显微镜广泛应用于生物学、细菌学、组织学、药物化学等研究工作中, 在医疗中可进行临床实验, 在学校实验室可供教学使用。其中 XSP-9CA 附有辅助接口, 可连接 CCD 摄像头、数码相机等图像设备。

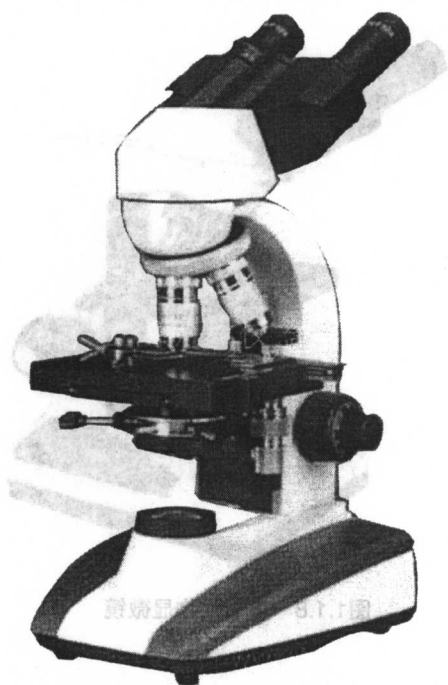


图1.1.6 XSP-2CA双目生物显微镜

2. 双目立体显微镜（双目解剖显微镜）

常用的双目立体显微镜如图 1.1.7 所示。



图1.1.7 双目立体显微镜

3. 摄影生物显微镜

摄影生物显微镜（图 1.1.8）是生物学、细菌学、组织学、免疫学、药理学、化学及农业、畜牧业等研究检查工作的理想仪器。可通过选配恰当的附件，使之具备相衬、摄影、暗场、偏光、荧光、双人观察、CCD 摄像等多种功能，满足实验的需要，成为实验中得心应手的工具。

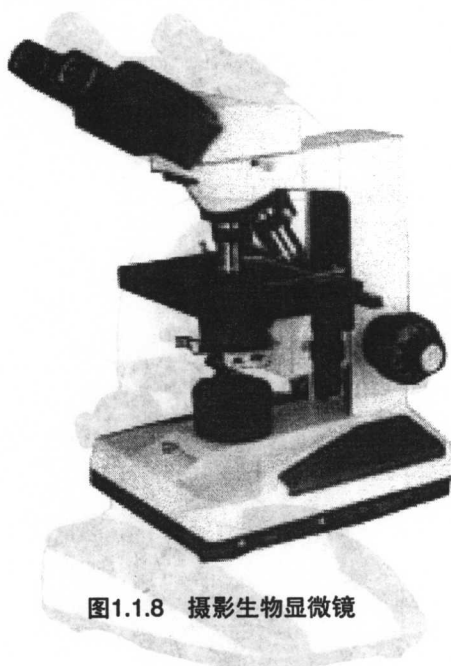


图1.1.8 摄影生物显微镜

4. 彩色电视显微镜

彩色电视显微镜（图 1.1.9）的电视显微总放大倍数为 $360\times\sim 9\,000\times$ 。

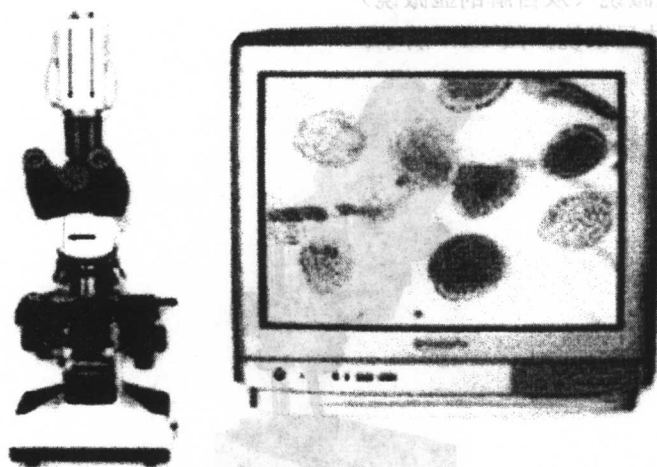


图1.1.9 彩色电视显微镜

5. 金相显微镜

金相显微镜（图 1.1.10、图 1.1.11）是将精锐的光学显微镜技术、先进的光电转换技术、尖端的计算机图像处理技术完美地结合在一起而开发研制成功的一项高科技产品。可以在计算机显示器上很方便地观察金相图像，从而对金相图谱进行分析、评定等，对图片进行输出、打印。



图1.1.10 金相显微镜（正置式）

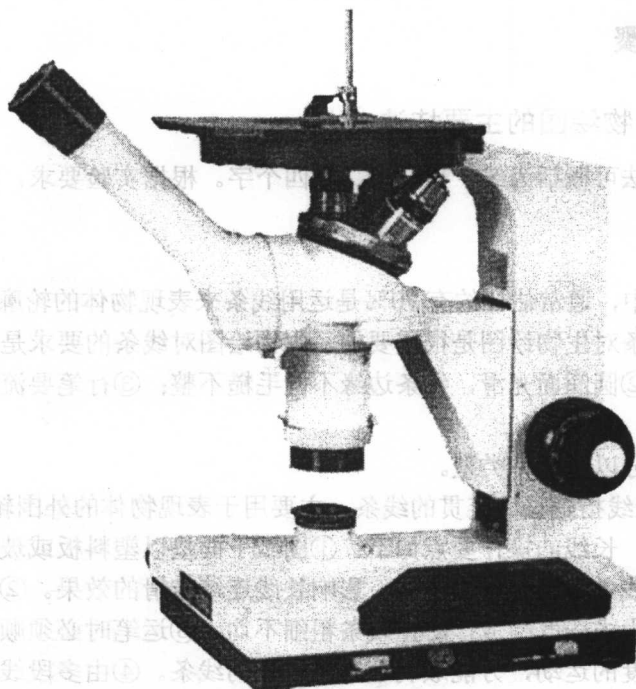


图1.1.11 金相显微镜（倒置式）

四、作业与思考题

- (1) 了解显微镜的结构, 熟悉各部分的名称和用途。
- (2) 如何正确使用显微镜观察生物标本, 使用时应注意什么?
- (3) 镜检玻片标本时, 为什么要先用低倍镜观察, 而不能直接用高倍镜或油镜观察?
- (4) 如何正确使用油镜?

附: 生物绘图技术

一、目的要求

- (1) 了解生物绘图的主要技法。
- (2) 学会生物绘图的基本技术。

二、材料与用品

蚕豆叶下表皮玻片标本、显微镜、铅笔、橡皮、小刀、直尺、绘图纸。

三、方法与步骤

(一) 了解生物绘图的主要技法

生物绘图的技法可概括为线、点、涂、染四个字。根据实验要求, 以下主要介绍线和点的技法。

1. 线

在黑白墨线图中, 通常估计约有 70% 是运用线条来表现物体的轮廓、特征、层次和明暗的, 所以运用线条对生物绘图是很重要的。生物绘图对线条的要求是: ①线条均匀, 一般不可时粗时细; ②圆润而光滑, 线条边缘不能毛糙不整; ③行笔要流畅, 不能中间顿促凝滞。

常用的线条可分以下几种类型。

(1) 长线。长线指延长而连贯的线条, 主要用于表现物体的外围轮廓、主要的脉纹、大型的皱褶等部位。长线的操作要点如下。①图纸下面垫以塑料板或玻璃台板, 务必使纸面平整, 以免造成线条中途停顿或不匀, 影响长线连续光滑的效果。②用力须均匀, 可以一笔绘成的线条, 力求一气呵成, 防止线条粗细不均。③运笔时必须顺着手势, 由左下角向右上作较大幅度的运动, 方能顺利地绘成较长的线条。④由多段线条连接完成的长线条, 衔接必须准确无误, 防止错位或首尾衔接粗细不匀; 为使线条衔接准确, 可执笔先稍离纸面, 顺着原来线条末端的方向, 以接线的动作, 空笔试接几次, 待手势动作有了把握后, 再将线段接上。