

21世纪生物学
基础课系列实验教材

李 芬 主编

细胞生物学实验技术

 科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪生物学基础课系列实验教材

细胞生物学实验技术

李 芬 主编

2007年10月第1期

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是细胞生物学实验教学改革的重要成果,从基础、综合和设计性三个层面设置实验 37 个。涵盖部分经典细胞生物学实验,并增添一些现代细胞和分子生物学新技术,内容包括光学及电子显微镜技术、细胞形态结构、细胞化学及组分分离、细胞分裂与 PCC、细胞培养和转染、FISH、免疫印迹、酵母双杂、细胞同步化及凋亡诱导与检测等技术。

本书可供综合性大学、农林、师范、医学院校生命科学相关专业本科生使用,也可作为相关研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验技术/李芬主编. —北京:科学出版社,
2007

(21 世纪生物学基础课系列实验教材)

ISBN 978-7-03-020288-8

I. 细… II. 李… III. 细胞生物学-实验-高等学校-
教材 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 155305 号

责任编辑:陈 露 李 瑾/责任校对:连秉亮

责任印制:刘 学 /封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

江苏省句容市排印厂印刷

南京理工出版信息技术有限公司照排

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 10 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2007 年 10 月第一次印刷 印张:9 1/4

印数:1—3 200

字数:172 000

定价:15.00 元

《细胞生物学实验技术》编写人员

主 编 李 芬

编 者 (以作者姓氏笔画为序)

马克学 李 芬 刘洪梅 杨献光

周 琳 姬生栋 梁卫红

前 言

细胞生物学是高等院校生命科学的主干课程之一,是一门实验性很强的学科。生命科学的许多重大发现源于细胞生物学实验技术的不断创新。因此,学习和掌握细胞生物学基本技术和最新实验方法,对于从事生命科学研究的工作者是非常必要的。

细胞生物学实验课的教学目的,主要是通过基本技能训练以及观察分析实验结果,使学生了解并掌握有关的实验技术原理和操作方法,进而培养学生动手实践、观察分析和解决问题的能力。为达到此目的,我们参阅国内外同行的大量资料并结合教学组多年来在教学和科研实践中积累的细胞生物学技术编写成《细胞生物学实验》一书,在加强学生的基本技能训练的同时,提高学生观察分析问题和解决问题的科学思维能力,为将来独立进行科学研究打下基础。

本书共 37 个实验,内容较丰富,知识面广;分为基础性实验、综合性实验和设计性实验三大部分。第一部分基础性实验主要包括显微镜技术、细胞形态结构观察、细胞化学、细胞化学成分分离、细胞分裂染色体观察以及细胞培养、细胞融合和流式细胞术等细胞生物学基本实验。第二部分综合性实验选编了荧光原位杂交确定特定核酸序列的定位、磷酸钙沉淀法将 DNA 导入细胞、RT-PCR 检测水稻肌动蛋白基因的表达、Western-Blot 检测 HeLa 细胞 HSP70 表达、重组 GFP 在洋葱细胞中瞬时表达的观察(基因枪导入法)、蛋白质与蛋白质相互作用检测——酵母双杂交筛选等现代细胞生物学和分子生物学相关技术。在第三部分设计性实验中编入了不同类群细胞大小及结构的比较、植物细胞中叶绿体的原位观察、不同方法制备同步化细胞的效果比较和细胞凋亡的诱导和检测 4 个实验。学生通过完成这些实验,可以加深对细胞生物学相关理论知识的认识,同时学习从事科学研究和撰写科研论文的基本方法,为将来独立从事科研工作奠定坚实的基础。

本书涉及的大多数实验采用生活细胞材料,由学生自己动手取材和实验,使学生能对细胞获得生动的认识。这些实验内容新颖、技术先进、可操作性强,对培养学生的动手能力、分析问题、解决问题能力和独立从事科学研究的能力很有帮助。书后有 6 个附录,为读者查询常用实验数据提供了方便,实用性强。本书可供高等师范院校生物科学和生物技术专业及相关专业的学生和教师使用。

本教材由李芬主编,由编写组成员通力合作而成。实验 18~23, 29, 31, 33, 36~37 和附录二由李芬编写。实验 10, 30, 32, 34 由梁卫红编写。实验 4, 14, 35 由姬生栋编写。实验 9, 12, 13 由马克学编写。实验 1, 3, 15, 16 由刘洪梅编写。实验 24, 25 由杨献光编写。实验 2, 5~8, 11, 26~28 和附录一、三、四、五、六由周琳编写。由于经验不足,水平有限,本教材一定还有很多缺点和错误,恳请广大读者批评指正。

编 者

2007 年 6 月

实验室规则

一、每次实验前必须充分预习实验讲义,回顾与实验相关的理论知识,以便充分了解实验的目的、原理和方法,避免发生错误,提高实验效果。

二、遵守实验纪律,按时到达实验室,不得迟到或早退。实验中途因故需外出时应向任课教师请假,进入实验室之前要换好实验服。

三、保持实验室安静,不许在实验室内大声喧哗及随意走动。

四、必须严肃认真地进行实验,严格按照操作规程进行,实验期间不得进行任何与实验无关的活动。

五、实验室内各组仪器及器材由各组自己使用,不得互相调换。要爱护仪器、标本和设备。如遇仪器损坏或不灵,应及时报告任课教师,以便修理或更换,不得自行乱修。损坏器材或设备者应按有关规定进行赔偿。

六、注意节约实验材料、药品和水、电等。

七、保持实验室内清洁整齐。实验结束后,各组必须认真清理各自的实验台面,将器材清洗后点清数目,然后摆放整齐。班级值日生负责清扫室内卫生,关好水、电开关和门、窗等,经教师检查合格后方可离开实验室。

八、动物尸体、滤纸片等实验废物应放到指定地点,不得随意乱丢。

九、实验作业为平时考查的内容之一,故应认真对待,不得草率从事,应按照各实验的要求及时完成。

十、有不遵守上述要求者,任课老师将终止其实验,并取消其当堂实验成绩。

细胞生物学实验绘图方法与要求

一、在仔细观察的基础上,选择典型结构进行描绘,绘图过程中应注意各部分结构的比例关系,真实、准确地描绘出相应的结构。

二、一律用铅笔绘图,线条要明确清晰。结构的深浅明暗一律以点的疏密来表示,点要圆且大小深度一致,不得涂暗影或进行其他美术加工。

三、各部结构名称要在一侧引直线注明,且各引线要平行不得交叉。

四、绘制观察到的细胞结构示意图,必须标注使用的显微镜和放大倍数。

五、绘图时每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当,并注意纸面的整洁美观。

六、图注应简要注明处理方法。

目 录

Contents

前言

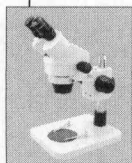
实验室规则

细胞生物学实验绘图方法与要求

第一部分 基础性实验

1

实验 1 普通显微镜及其使用	1
实验 2 特殊显微镜及其使用	6
实验 3 石蜡切片法制备光学显微标本	15
实验 4 冰冻切片法制备光学显微标本	21
实验 5 透射电子显微镜及样品制备	24
实验 6 扫描电子显微镜及样品制备	29
实验 7 细胞形态观察、大小测量和死活细胞鉴定	32
实验 8 液泡系的超活染色与动态观察	34
实验 9 线粒体超活染色技术与数目统计	36
实验 10 细胞骨架观察——微丝观察	37
实验 11 细胞骨架观察——微管观察	40
实验 12 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶染色技术	42
实验 13 核仁组织区银染色技术(Ag-Nor 染色法)	44
实验 14 多糖的细胞化学显示法——PAS 反应	46
实验 15 DNA 的细胞化学显示法——Feulgen 反应	50
实验 16 RNA 的细胞化学显示法——Brachet 反应	51
实验 17 细胞器的分离与鉴定	53
实验 18 动物细胞基因组 DNA 组提取	56
实验 19 植物细胞基因组 DNA 提取	58
实验 20 酿酒酵母 RNA 提取	61
实验 21 细胞无丝分裂和有丝分裂的形态观察	63
实验 22 细胞减数分裂的形态观察	65
实验 23 超前凝集染色体标本的制备与观察	69



实验 24	细胞的原代培养	71
实验 25	细胞的传代培养	74
实验 26	细胞融合	76
实验 27	流式细胞仪测定细胞 DNA 含量	77

第二部分 综合性实验 81

实验 28	荧光原位杂交确定特定核酸序列的定位	81
实验 29	磷酸钙沉淀法将 DNA 导入细胞	84
实验 30	RT-PCR 检测水稻肌动蛋白基因的表达	86
实验 31	Western-Blot 检测 HeLa 细胞 HSP70 表达	89
实验 32	重组 GFP 在洋葱细胞中瞬时表达的观察(基因枪导入法)	94
实验 33	蛋白质与蛋白质相互作用检测——酵母双杂交筛选	95

第三部分 设计性实验 103

实验 34	不同类群细胞大小和结构的比较	103
实验 35	植物细胞中叶绿体的原位观察	106
实验 36	不同方法制备同步化细胞的效果比较	108
实验 37	细胞凋亡的诱导和检测	111

附 录 117

附录一	离心机转数与离心力的换算表	117
附录二	常用溶液的配制和使用	118
附录三	生物标本常用染料性能简介	130
附录四	常用玻璃、塑料仪器的清洗和干燥	133
附录五	常用单位	135
附录六	药品规格	136

参考文献 137

第一部分 基础性实验

实验 1 普通显微镜及其使用

【实验目的】

熟悉普通光学显微镜的基本构造和性能,掌握使用方法。

【实验原理】

一、普通光学显微镜的基本构造

普通光学显微镜是最常用的一种光学显微镜,主要由机械系统和光学系统组成。

(一) 机械系统

显微镜的机械系统是显微镜的重要组成部分,其作用是固定与调节光学镜头,固定与移动标本等,主要由镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器与调焦装置组成。

1. 镜座

镜座是显微镜的基本支架,它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒,它是用来安装光学放大系统部件的基础。

2. 镜筒

镜筒上接目镜,下接物镜转换器,形成接目镜与接物镜(装在转换器下)间的暗室。

从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化,不仅放大倍率随之变化,而且成像质量也受到影响。因此,使用显微镜时,不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160 mm,此数字标在物镜的外壳上。

3. 物镜转换器

物镜转换器上可安装 3~4 个接物镜,一般是 3 个接物镜(低倍、高倍、油镜)。转动转换器,可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通,与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

4. 载物台

载物台中央有一孔,为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推动器,其作用为固定或移动标本的位置,使得镜检对象恰好位于视野中心。

5. 推动器

推动器是移动标本的机械装置,它是由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成的。好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺,构成很精密的平面坐标系。如果我们须重复观察已检查标本的某一部分,在第一次检查时,可记下纵横标尺的数值,以后按数值移动推动器,就可以找到原来标本的位置。

6. 调焦装置

调焦装置一般位于镜壁的下端,是移动镜筒、调节接物镜和标本间距离的机件,包括粗调旋钮和细调旋钮。粗调旋钮旋转一圈可使载物台升降 10 mm,一般用于低倍镜调焦。细调旋钮每转一圈载物台缓慢升降 0.1 mm(100 μm),一般用于高倍镜、油镜和分辨物像清晰度调焦。

(二) 光学系统

普通光学显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜和接目镜等组成。聚光器、接物镜和接目镜各自相当于一个正透镜,显微镜的光学系统就是根据透镜成像的原理对微小物体进行放大的。其基本成像原理:被检物放在聚光器和物镜之间,光线通过物镜在镜筒中形成一个倒立的放大实像,目镜又将此倒立实像进一步放大成倒立虚像,通过调焦装置使此虚像落在人眼的明视距离(250 mm)处,即倒立虚像通过眼球后,在视网膜上形成正立实像,此实像与倒立虚像相吻合。

1. 反光镜

反光镜位于镜座上,是一个可以随意转动的双面镜。一面为平面,一面为凹面,其作用是将任何方向射来的光线反射到聚光器透镜的中央,照明标本。平面镜反射光线的能力较弱,是在光线较强时使用,凹面镜反射光线的能力较强,是在光线较弱时使用。较新的高档次显微镜镜座上装有光源,并有电流调节螺旋,可通过调节电流大小调节光照强度。

2. 聚光器

聚光器在载物台下面,它是由聚光透镜、光圈和升降螺旋组成的。其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上,以得到最强的照明,使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以用升降螺旋调节,使焦点落在被检物体上,以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25 mm 处,而其上升限度为载物台平面向下 0.1 mm。因此,要求使用的载玻片厚度应在 0.8~1.2 mm 之间,否则被检样品不在焦点上,影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有可变光阑,也叫光圈,位于聚光镜的下方,由十几张金属薄片组成,中心部分形成圆孔。其作用是调节光强度和使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径相适应。可变光阑开得越大,数值孔

径越大。

3. 物镜

物镜安装在镜筒前端转换器上,物镜的性能取决于物镜的镜口率(numerical aperture, NA),每个物镜的镜口率都标在物镜的外壳上,镜口率越大,物镜的性能越好。一般根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同,可分为:①干燥系物镜,以空气为介质,如常用的 $40\times$ 以下的物镜,镜口率均小于 1;②油浸系物镜,常以香柏油为介质,此物镜又叫油镜头,其放大率为 $90\times\sim 100\times$,镜口率大于 1。根据物镜放大率的高低,可分为:①低倍物镜,指 $1\times\sim 6\times$,NA 值为 $0.04\sim 0.15$;②中倍物镜,指 $6\times\sim 25\times$,NA 值为 $0.15\sim 0.40$;③高倍物镜,指 $25\times\sim 63\times$,NA 值为 $0.35\sim 0.95$;④油浸物镜,指 $90\times\sim 100\times$,NA 值为 $1.25\sim 1.40$ 。

4. 目镜

目镜装在镜筒上端,通常由两块透镜组成,上端的一块透镜称“接目镜”,下端的透镜称“场镜”。上下透镜之间或在两个透镜的下方,装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”,物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处,所以其上可安置目镜测微尺。

二、普通光学显微镜的性能

显微镜的性能指标主要有分辨率、放大率、焦点深度、镜像亮度和视场亮度等,这些指标都有一定的限度,彼此间相互作用又互相制约。

1. 分辨率

分辨率又称分辨力,物镜的分辨力即显微镜的分辨率。目镜与显微镜的分辨率无关。物镜分辨力是指能清晰地分辨被检样品中两个物体点的最短距离的能力。

通常用下列公式计算:

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

其中, R : 分辨率;

λ : 照明光线波长;

$N.A.$: 物镜数值孔径。

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。

2. 放大率

放大率也称为放大倍数。显微镜的总放大倍数等于目镜和物镜放大倍数的乘积。物镜放大率是对一定镜筒长度而言的,镜筒长度的变化,不仅导致放大率变化,而且成像质量也受到影响。适宜的总放大率是所用物镜数值孔径的 $500\sim 1000$ 倍,在此范围称作有效放大率。如果高于上述范围,微细结构分辨不清,为空的放大。低于上述范围时由于放大率过低,难以观察。

3. 焦点深度

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。显微镜的焦深可变,它与物镜的镜口率和总放大率成反比。因此高放大率和高镜口率显微镜的焦深就浅,需边观察边调节焦距,才能看到标本的全厚度。

4. 镜像亮度和视场亮度

镜像亮度是指显微镜下图像的明暗程度,其数值与镜口率的平方成正比,与总放大倍数成反比。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,还受聚光器、光阑和光源等因素的影响。在不更换物镜和目镜的情况下,视场亮度越大,镜像亮度也越大。

【实验用品】

普通光学显微镜、人口腔上皮细胞装片。

【实验方法】

取人口腔上皮细胞装片练习显微镜的使用操作及注意事项。

一、观察前的准备

1) 取显微镜时,应用右手紧握镜臂,左手托住镜座,平稳地将显微镜放到实验桌上。

2) 显微镜一般放在身体的左前方,离桌子边缘约 10 cm 左右,右侧可放记录本或绘图纸。

3) 调节光照:将 10×物镜转入光孔,聚光器上的光圈开到最大位置,左眼观察目镜中视野的亮度,转动反光镜,使视野的光照达到明亮均匀为止。自带光源的显微镜,可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

4) 调节光轴中心:显微镜在观察时,其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。带视场光阑的显微镜,先将光阑缩小,用 10×物镜观察,在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像,如此像不在视场中央,可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央,然后缓慢地将视场光阑打开,能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接,说明光线已经合轴。

二、低倍镜观察

镜检标本时须先用低倍镜观察。因为低倍镜视野较大,易于发现目标和确定检查的位置。标本片置于载物台上,用标本夹夹住,移动推动器,使被观察的标本位于

物镜正下方;转动粗调节旋钮,使物镜调至接近标本处,用目镜观察同时旋转粗调节旋钮慢慢升起镜筒(或下降载物台),直至物像出现,再用细调节旋钮调焦使物像清晰。用推动器移动标本片,找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

三、高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜,低倍、高倍镜头是同焦的,在正常情况下,高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜,在转换物镜时要从侧面观察,避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察,调节光照,使亮度适中,缓慢调节粗调节旋钮,使载物台上升(或镜筒下降),直至物像出现,再用细调节旋钮调至物像清晰为止,找到需观察的部位,并移至视野中央进行观察。

四、油镜观察

油浸物镜的工作距离(指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离)很短,一般在 0.2 mm 以内。使用油浸物镜时要特别细心,避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使物镜受损。使用油镜按下列步骤操作:

- 1) 先用粗调节旋钮将镜筒提升(或将载物台下降)约 2 cm,并将高倍镜转出。
- 2) 在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。
- 3) 从侧面注视,用粗调节旋钮将载物台缓缓地上升(或镜筒下降),使油浸物镜浸入香柏油中,使镜头几乎与标本接触。
- 4) 向目镜内观察,放大视场光阑及聚光镜上的光圈,上调聚光器,使光线充分照明。用粗调节旋钮将载物台徐徐下降(或镜筒上升),当出现物像后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物象,必须再从侧面观察,重复上述操作。
- 5) 观察完毕,下降载物台,将油镜头转出,先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用擦镜纸蘸少许乙醚酒精混合液(乙醚 2 份,纯酒精 3 份)或二甲苯,擦去镜头上残留油迹,最后再用擦镜纸擦拭 2~3 下即可(注意向一个方向擦拭)。
- 6) 将各部分还原,转动物镜转换器,使物镜头不与载物台通光孔相对,再将镜筒下降至最低,降下聚光器,反光镜与聚光器垂直,用一个干净手帕将接目镜罩好,以免目镜头沾上灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分,然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

【作业】

- (1) 简述显微镜光路合轴调中方法。
- (2) 简述使用显微镜时的注意事项。

实验2 特殊显微镜及其使用

I. 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)的聚光镜中央有遮光片,使得照明光线不能直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的,利用这种显微镜能见到小至4~200 nm的微小粒子。

【实验目的】

1. 学习暗视野显微镜的原理、了解其构造。
2. 练习暗视野显微镜的使用。

【实验原理】

一、暗视野显微镜设计原理

暗视野显微镜的设计应用了丁达尔现象(Tyndall phenomenon:在光的传播过程中,光线照射到粒子时,如果粒子大于入射光波长很多倍,则发生光的反射;如果粒子小于入射光波长,则发生光的散射,这时观察到的是光波环绕微粒而向其四周放射的光,称为散射光。从光束的侧面可以看到一条发亮的光柱,丁达尔效应就是光的散射现象)。通过特殊的聚光器——暗视野聚光器。由于聚光器的特殊构造,入射光线在聚光器顶透镜或盖片的上表面发生全反射,不能入射物镜之内,所以显微镜视野是暗的;但是,装片上的样品被入射光斜向照明,并发出散射光。这些被标本散射的光可以进入物镜,通过目镜被我们检测到。镜检时,因不能直接观察到照明光线,与光轴垂直的平面视场暗黑,在深暗的背景上能清晰地看到由散射光和反射光形成的明亮的物体影像,物像与背景造成极大的反差,使样品更明显。视场内的样品,被斜射光线照明,可从样品各种结构表面散射和反射光线,看到许多细胞器的明亮轮廓,诸如细胞核、线粒体、液泡以及某些内含物等,能够观察到4~200 nm之间的微粒子的存在和运动,但不能看清其内部结构。

二、暗视野显微镜的特殊构造

为了实现显微镜的暗视野,采用了特殊的聚光器——暗视野聚光器,常用的暗视野有两种:抛物面聚光器和心形聚光器,本实验主要介绍抛物面聚光器。在这种特殊的聚光器中,聚光镜和光阑都具有特殊的构造。聚光镜为抛物面体,上下为与光轴垂直的平面;光阑中央为较大的圆形暗视野光挡,遮住照明光束中央部分的光线,使之不能进入物镜,得到暗的视野。外周为环状的透光光阑,使得入射光为一

个光环(如图 2-1 所示)。入射的光环经抛物面聚光镜反射,会聚于样品处,斜向照亮样品,样品发出反射光和散射光,进入光路被检测到,呈现为明亮的物体。

暗视野聚光器是暗视野显微镜的专用附件,可以更换下普通聚光器而把普通光学显微镜变为暗视野显微镜。在使用暗视野聚光器时要注意选择与物镜的数值孔径合理匹配的聚光器,载玻片的适宜厚度应在 $0.8 \sim 1.2 \text{ mm}$,还要有足够强的照明强度。

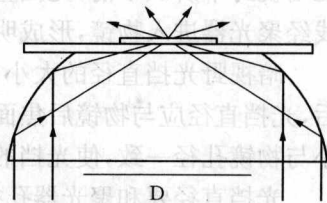


图 2-1 抛物面聚光器及其光路
入射光发生全反射,样品被照明并射出反射光,散射光进入物镜

三、自己动手制作暗视野显微镜

暗视野显微镜与普通光学显微镜的区别,主要在于照明方法有别。也就是说,暗视野显微镜采用的是暗视野照明方式。除了暗视野聚光器法以外,中心遮光法也可以实现暗视野照明。

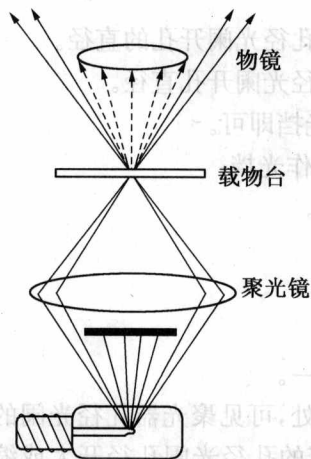


图 2-2 中心遮光法原理示意图

中心遮光法就是用暗视野光挡(dark field stop)遮去中央光束,然后将这样的圆形光挡放在聚光器下面的滤光片支架上,修整遮光面积大小,使聚集在聚光器焦点的直接照明光线被暗视野光挡遮掉,视野基本黑暗,而保证侧面斜射过来的光照亮被检物。原理见图 2-2。

暗视野光挡可以用黑纸、厚卡纸或金属片制作,都可以遮住照明光束中央部分的光线,使之不能进入物镜,而取得暗视野照明的效果。照明光线从光挡周缘呈环形光束通过聚光镜斜向照明被检样品,被照明的样品产生反射光和散射光进入物镜,形成可见的明亮影像。此法简便易行,不要特殊设备与条件。只将中央光挡加放在聚光器下方,滤光镜托架上即可。实验成功与否,关键在于暗视野光挡的制作,其中尤以光挡的直径更为重要。

暗视野光挡的制作,可采用两种不同样式或在一透明滤色镜中央贴一圆形黑纸制成,或用厚卡纸或金属片剪成如图 2-3 所示的样式。

1. 暗视野光挡制作方法

光挡直径决定照明光线中央光束的面积或阻断量,直径不宜直接影响暗视野照明

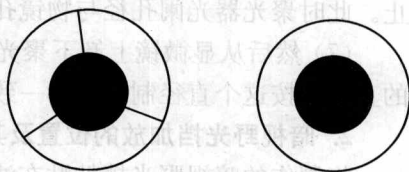


图 2-3 暗视野光挡

左:金属片或厚卡纸制成;
右:透明滤色镜贴黑纸制成

效果。光挡直径大,阻光过多,使周缘可透光线减少影响对样品的斜向照明,使之在暗视野中辨认不清;光挡直径太小,阻光不够,进入聚光器的光线过多,使部分光线经聚光器进入物镜,形成明视场照明,影响了暗视野效果。

暗视野光挡直径的大小,取决于所用物镜的数值孔径值,当物镜对样品聚焦后,光挡直径应与物镜后焦面的通光孔径相当,即光挡在物镜后焦面所成影像的大小与物镜孔径一致,使光挡的影像恰好遮住物镜的通光孔径。

光挡直径要和聚光器孔径光阑的大小一致,孔径光阑的大小又和物镜的数值孔径一致。所以,找到聚光器孔径光阑调节环上标有的数值孔径值,按下列方法确定光挡直径:

(1) 察看所用物镜外壳上标示的数值孔径值。例如,20×物镜数值孔径为0.40 标示20/0.40。

(2) 转动聚光器孔径光阑调节环,将与物镜数值孔径相等的聚光器数值孔径值对准基线(点)。例如,使用20/0.40物镜时,将聚光器孔径光阑调节环上标示的0.40的数值孔径值对准基线。

(3) 从显微镜上卸下聚光器,用圆规两脚尖端量出孔径光阑开孔的直径。

(4) 用直尺量出圆规两脚尖端的距离,即聚光器孔径光阑开孔直径。

(5) 按聚光器孔径光阑开孔直径制作大小一致的光挡即可。

如果聚光器没有数值孔径标度,则采用下列方法制作光挡:

(1) 转动聚光器升降旋钮,使聚光器达到最高位置。

(2) 用低倍镜对样品聚焦。

(3) 聚光器合轴调中,使其光心与光轴合一。

(4) 将欲使用的物镜,旋入光路,对样品聚焦。

(5) 从目镜筒中取出目镜,若为双筒目镜可任取其一。

(6) 通过目镜筒向下观察,于物镜透镜中的后焦面处,可见聚光器孔径光阑的影像。往复旋转孔径光阑调节环或拨动调节杆,使可变的孔径光阑孔径开大或缩小,变化中的光阑影像在物镜中可辨。光阑完全闭合时,物镜中心尚有一明亮小孔,随孔径光阑逐渐开放。亮孔由中心向周缘扩展。当孔径光阑的开孔或亮孔扩大到与物镜的最大孔径相当即孔径光阑开孔内缘与物镜孔径的内缘重合时当即停止。此时聚光器光阑孔径与物镜孔径相当。

(7) 然后从显微镜上卸下聚光器,用圆规两脚尖端和直尺量出孔径光阑开孔的直径。按这个直径制作大小一致的光挡即可。

2. 暗视野光挡加放的位置及其调整

将制作的暗视野光挡粘贴在滤色镜中央部位并加放在聚光器下的滤色镜支架上,使光挡的中心准确地位于显微镜光轴的轴心部位。否则,因暗视野光挡中心偏移,使部分入射光进入物镜之内,破坏暗视野的效果。

