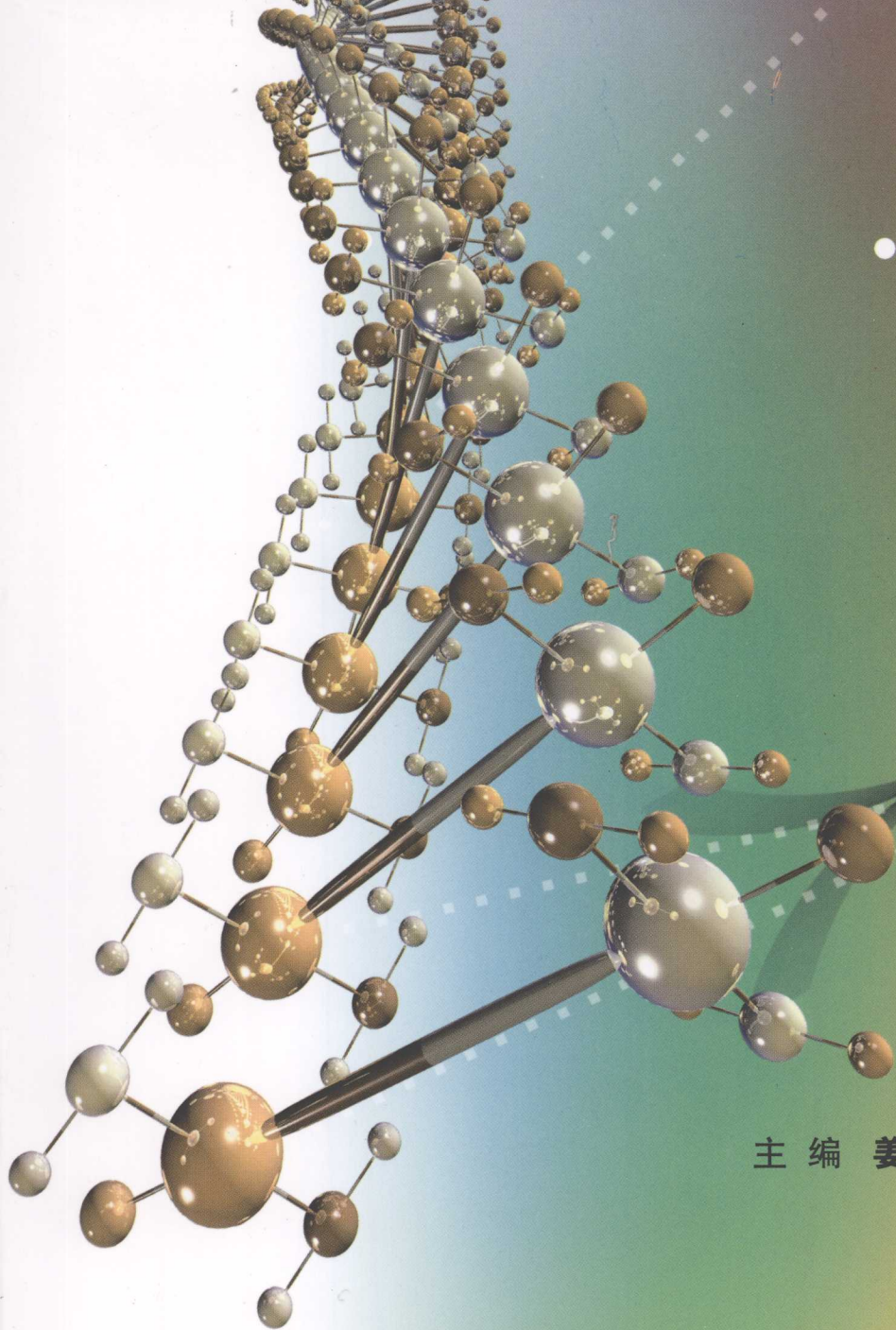
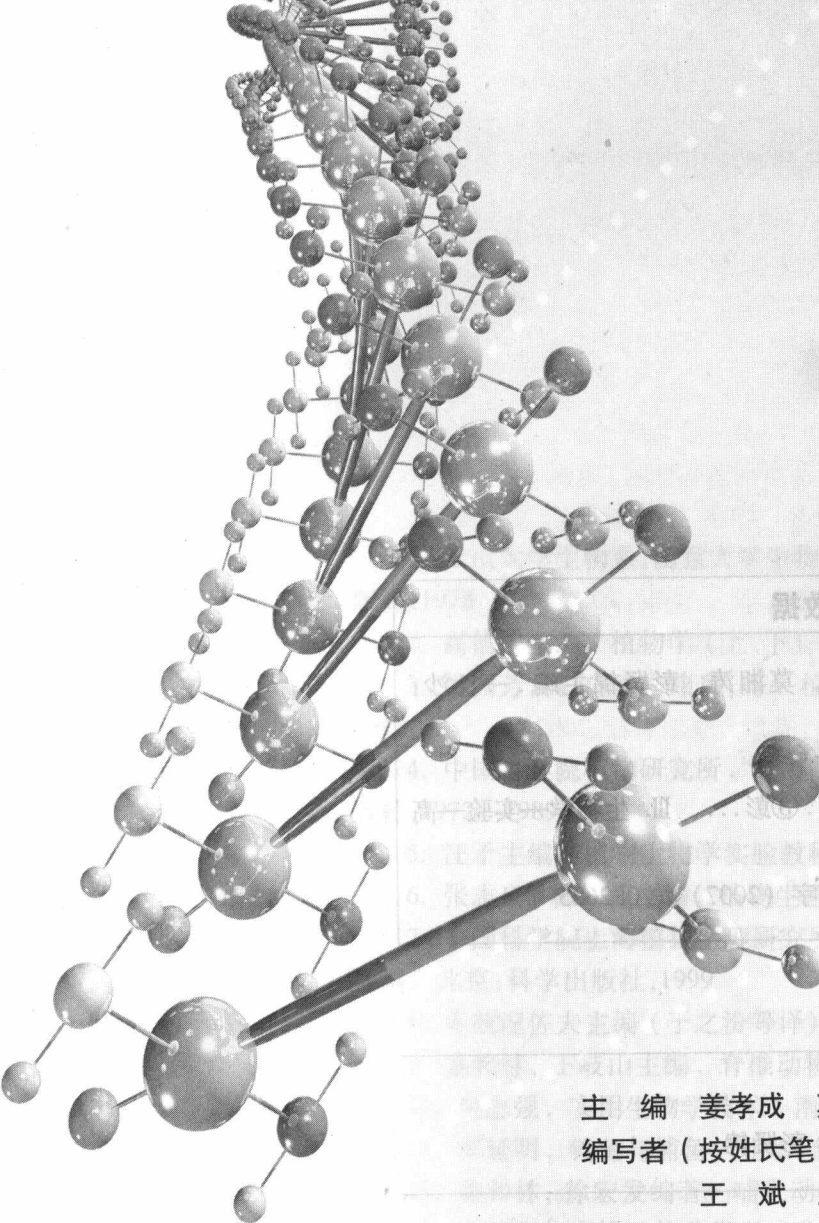




主 编 姜孝成 莫湘涛 彭贤锦

生物学实验教程

湖南师范大学出版社



主 编 姜孝成 莫湘涛 彭贤锦
编写者 (按姓氏笔画)

王 斌	王晓辉	邓学建	刘如石	刘克明
孙运军	李 烨	李永青	李建宗	邱义兰
张 平	陈 宇	陈湘定	胡志强	段志贵
姜孝成	袁葵洲	莫湘涛	唐文岷	彭贤锦
曾雄智	谢伟岸	赖 勤	颜亨梅	戴玉池

生物学实验教程

湖南师范大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物学实验教程 / 姜孝成, 莫湘涛, 彭贤锦主编. —长沙:
湖南师范大学出版社, 2007. 7

ISBN 978 - 7 - 81081 - 748 - 6

I. 生... II. ①姜... ②莫... ③彭... III. 生物学—实验—高
等学校—教材 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 082635 号

生物学实验教程

◇主 编: 姜孝成 莫湘涛 彭贤锦

◇策划组稿: 宋 瑛

◇责任编辑: 宋 瑛

◇责任校对: 胡晓军

◇出版发行: 湖南师范大学出版社

地址/长沙市岳麓山 邮编/410081

电话/0731. 8853867 8872751 传真/0731. 8872636

网址/http: //press. hunnu. edu. cn

◇经销: 湖南省新华书店

◇印刷: 国防科技大学印刷厂

◇开本: 787 × 1092 1/16

◇印张: 35.5

◇字数: 864 千字

◇版次: 2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月第 1 次印刷

◇印数: 1—2000 册

◇书号: ISBN 978 - 7 - 81081 - 748 - 6

◇定价: 55.00 元

序

有人称 21 世纪是生命科学的世纪。因为生命科学的发展日新月异，对人类社会的影响将越来越大，世界面临的粮食、能源、环境、资源和人口等问题无一不与生命科学的发展有关。大学阶段是培养学生适应社会发展和需要所必需的综合思维和能力的关键时期，对于生命科学相关专业的大学生，强调其实践操作、问题分析、知识概括和创新思维等能力的培养尤显重要。湖南师范大学生命科学学院一直重视这一工作。《生物学实验教程》的出版将有力地推动当今形势下生命科学相关专业的实验教学。

《生物学实验教程》是湖南省普通高等学校基础课示范实验室——湖南师范大学生物学实验中心建设的重要内容之一，是面向 21 世纪生物学实验教学内容 and 教学体系改革的具体实践。它较为全面和系统地按照生命科学的研究方法和技术从简单到复杂、学生思维从低级到高级的发展规律，同时注重植物学、动物学、微生物学、遗传学、发育生物学、生物化学和分子生物学等分支课程知识之间的交叉与渗透，把经典的实验内容与前沿的新技术有机结合在一起，相关实验内容高度综合，改革原有实验教学方法和体系，将生命科学实验体系构建成生物学基础实验、生物学分析与测试实验和现代生物技术与应用实验三大模块。该实验教学体系的实施将有助于在生命科学实验教学中培养学生的综合素质和创新思维。

湖南师范大学生命科学学院前身为 1953 年创立的湖南师范学院生物系，长期以来一直重视生物实验教学。参加本书编写工作的人员是教学第一线的具有丰富教学工作经验的老教师或是具有博士学位的年轻学者。本书的形成既是学院多年来实验教学的知识积累的结晶，同时也注意收集了同行高等院校生物学实验教学的先进经验。可以相信，该书的面世对于促进生物学实验教学改革将发挥积极作用。生物学实验教学毕竟是一项永久性工程，其教学体系和方法需要在实践中不断发展和完善。书中存在的不足之处在所难免，还望同行专家和读者不吝赐教。

中国工程院院士

2007 年 5 月 30 日

前 言

认识生命现象的本质离不开实验操作和技术。生物学实验教学应该依照学生的认知规律,循序渐进地培养学生的认知能力和实践操作能力,同时还要培养学生的创新思维。《生物学实验教程》就是遵循这个原则,按照生命科学研究方法和技术从简单到复杂,学生思维从低级到高级的发展规律,同时注重植物学、动物学、微生物学、遗传学、发育生物学、生物化学、分子生物学等分支课程的知识交叉与渗透,把经典的实验内容与前沿的新技术有机融合,形成了适应时代要求的生物学实验教学体系,它包含三大模块:生物学基础实验、生物学分析与测试实验和现代生物技术与应用实验。生物学基础实验主要包含观察和认识生物形态与结构及功能及其与环境的关系,认识生物系统发育与演化的规律和特点等相关内容的基本实验操作和技能;生物学分析与测试实验侧重培养学生应用各类分析测试仪器从事科学研究的技能,初步掌握从生理生化角度分析和解释生命现象的方法;现代生物技术与应用实验强调多种实验技能的综合,与前沿科学研究和生产实际紧密结合,如蛋白质的提取、纯化与功能分析,DNA重组、转化与突变体筛选,啤酒、果汁饮料的生产,食用菌的栽培等实验,使学生形成从事生命科学研究的思维,培养其发现和分析问题的能力以及创新思维等。该实验教学体系的实施将有力地促进生命科学实验教学的改革。

本书的编写是湖南省普通高等学校基础课示范实验室——湖南师范大学生物学实验中心建设项目的重要内容之一。其出版得到了湖南省教育厅、湖南师范大学和湖南师范大学生命科学学院领导的大力支持。参加本书组稿和编写的老师有李建宗、刘克明、邓学建、颜亨梅、胡志强、彭贤锦、姜孝成、袁葵洲、李永青、莫湘涛、戴玉池、陈湘定、张平、赖勤、谢伟岸、曾雄智、刘如石、邱义兰、王斌、孙运军、陈宇、段志贵、李烨、唐文岷、王晓辉等。他们是教学第一线的具有丰富实验教学工作经验的教师或是具有博士学位的年轻学者。本书的完成还得到了湖南师范大学生命科学学院陈良碧、黎维平、夏立秋、丁学知、王贤纯、陈平、刘少军、肖亚梅、邓乐、王跃群、汪保和、杨海明、常海燕、李小曼、莫小阳、龙顺敏、刘曼媛、单茶秀、傅鹏等老师的大力支持。在此,谨致以诚挚的谢意。

由于时间和水平有限,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指正,以便再版时修改。

编 者

于湖南师范大学生命科学学院

2007年5月28日

目 录

第一部分 生物学基础实验

实验 1 显微镜的构造和使用	(2)
实验 2 高等植物的形态结构与功能分析	(17)
实验 3 植物组织和细胞的结构与功能分析	(34)
实验 4 细胞有丝分裂的观察及其标本制作	(42)
实验 5 低等植物系统学特征、多样性和功能分析	(44)
实验 6 高等植物系统学特征和多样性分析	(62)
实验 7 植物分类检索表的编制和应用	(70)
实验 8 野外植物多样性调查与研究	(72)
实验 9 无脊椎动物系统学特征和多样性分析	(74)
实验 10 脊索动物形态结构和生存适应性特征分析	(113)
实验 11 脊椎动物主要器官的解剖学与功能分析	(118)
实验 12 常见脊椎动物的识别	(188)
实验 13 动物标本的制作	(223)
实验 14 脊椎动物的野外观察与研究	(228)
实验 15 巨噬细胞吞噬现象的观察	(233)
实验 16 显微摄影术	(235)
实验 17 微生物形态多样性及其鉴定	(244)
实验 18 人体组织的结构与功能分析	(263)
实验 19 人体器官和系统的结构与功能适应性分析	(273)
实验 20 神经的形态与功能分析	(296)
实验 21 文昌鱼的胚胎发育观察	(311)
实验 22 动物生殖细胞发育规律和受精过程的细胞学观察与分析	(312)
实验 23 蛙和鱼类早期胚胎发育的特点与人工繁殖	(319)

第二部分 生物学分析与测试实验

实验 24 可溶性糖的测定和成分分析	(324)
实验 25 氨基酸的总量测定和纸层析分离鉴定	(326)
实验 26 核糖核酸的分离、组分鉴定与定量分析	(330)
实验 27 食品质量的检测分析	(332)
实验 28 酶的制备、活力及功能测定	(342)
实验 29 培养基的配制	(366)
实验 30 细菌增殖曲线的测定	(374)

实验 31	小型自控发酵罐的原理及其操作与应用	(376)
实验 32	细菌的生理生化反应试验	(381)
实验 33	水样的细菌学检查	(389)
实验 34	自然环境中目的微生物的分离和纯化	(396)
实验 35	染色体的制备与核型分析	(405)
实验 36	乳糖操纵子调控机制	(417)
实验 37	果蝇饲养、性状观察和杂交实验	(418)
实验 38	细胞膜的渗透性和细胞渗透势的测定	(422)
实验 39	植物组织水势的测定(小液流法)	(425)
实验 40	叶绿体活性和叶绿素的含量与性质测定	(427)
实验 41	植物呼吸代谢和呼吸强度测定	(430)
实验 42	种子生活力的快速测定	(433)
实验 43	植物根系的活力测定	(435)
实验 44	环境因子对植物生理代谢的影响	(436)
实验 45	生物机能系统的操作: BL-410 系统的使用	(439)
实验 46	感受机能的检测	(440)
实验 47	肌肉组织的生理特性分析与研究	(446)
实验 48	神经系统的信号传导与功能分析	(460)
实验 49	生理机能的神经和体液调节作用分析	(466)
实验 50	神经调节机制分析	(469)

第三部分 现代生物技术与应用实验

实验 51	电泳技术及其应用	(472)
实验 52	柱层析法分离蛋白质混合物	(480)
实验 53	线粒体的分离与纯化	(483)
实验 54	E. coli 感受态细胞的制备, 质粒 DNA 的转化、提取与纯化和酶切鉴定	(485)
实验 55	Northern blot 杂交	(490)
实验 56	真核生物基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增目的基因	(494)
实验 57	动物免疫	(497)
实验 58	抗体制备和酶联免疫吸附试验(ELISA)	(502)
实验 59	抗原抗体反应	(508)
实验 60	植物组织培养	(512)
实验 61	动物细胞培养	(515)
实验 62	啤酒发酵与品质鉴定	(517)
实验 63	红曲固体发酵	(526)
实验 64	果汁饮料的生产	(534)
实验 65	食用菌菌种分离、制备及生产实践	(541)
附录		(543)
参考文献		(559)

生物学基础实验

第一部分

生物学基础实验

实验一

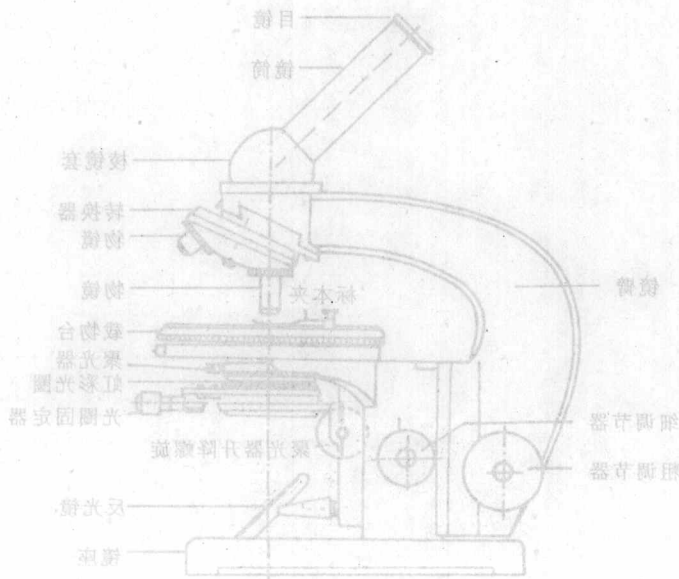
实验二

实验三

实验四

实验五

实验六



生物学基础实验 1-1图

实验1 显微镜的构造和使用

I 普通光学显微镜的构造及使用

一、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。

二、实验原理

重点阐述普通光学显微镜的光学部件及显微镜的操作技术。

三、实验器材

普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、生物制片标本、擦镜纸、洋葱、碘液。

四、实验步骤

(一) 显微镜的光学部件

光学部件通常由灯源、物镜、目镜、聚光器等组成(图1-1)。

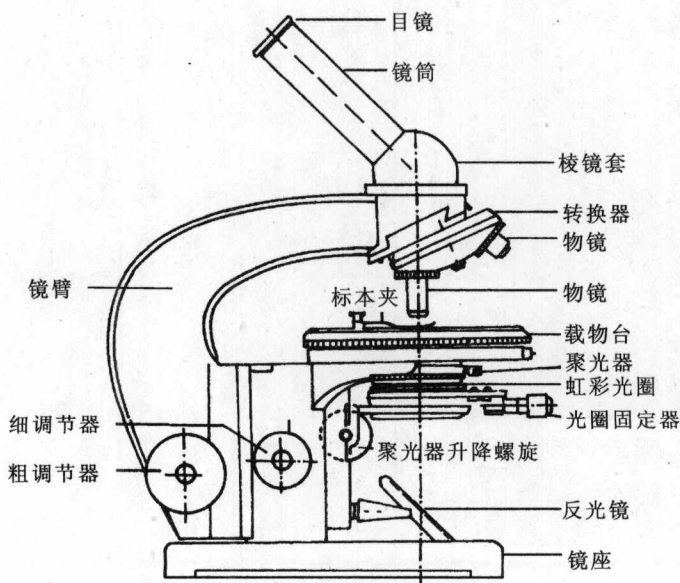


图1-1 普通光学显微镜的构造

1. 物镜

学生平常用的显微镜含有4倍、10倍、40倍和100倍4个物镜。4倍和10倍物镜放大倍数低,称为低倍镜;40倍和100倍物镜放大倍数高,称为高倍镜。

另外,4倍、10倍、40倍物镜在镜检时,物镜与盖玻片之间不添加任何液体,称为干燥系物镜;而100倍的物镜在镜检时,在前透镜与盖玻片之间加入香柏油,称为油镜。

物镜的数值孔径,通常简写为 $N \cdot A$,其值多用数字刻在物镜的外壳上,如0.25、0.65和1.3等,且常和放大倍数写在一起,如10/0.25,40/0.65和100/1.3等。数值孔径越大,物镜的分辨率越高。

2. 目镜

目镜作为影像和肉眼间的放大镜,将物镜产生的影像做第二次放大。目镜不能提高分辨率,显微镜的分辨率由物镜决定。目镜可以提高显微镜的总放大率,但总放大率绝非愈高愈好,而是有其适量范围,即最低和最高值。适宜的总放大率是所用物镜数值孔径的500~1000倍,在此范围内称有效放大率。

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率:

$$0.65 \times 500 \sim 0.65 \times 1000 = 325 \sim 650$$

再用物镜放大倍数除有效放大率:

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

应选用放大倍数为8倍至16倍之间的目镜。现在的显微镜一般只配备10倍的目镜。

总之,显微镜的总放大率超过物镜数值孔径的1000倍时,微细结构分辨不清,图像模糊,为空的放大;低于500倍时,由于放大率过低,肉眼难以分辨。

3. 聚光器

聚光器将来自光源的光线聚成光束,透过载玻片照明样品。

聚光器由聚光镜和孔径光阑构成。孔径光阑位于聚光镜下方,光阑的孔径可改变,以调节进光量。孔径光阑的开孔要适度。开孔过小,图像的反差大,但分辨率降低,还可能产生光的衍射,降低成像质量;开孔过大,造成视野亮度过大,引起产生眩光,降低影像的清晰度和反差。

4. 显微镜的光源

照明光源以钨丝灯和卤钨灯为多。卤钨灯优于钨丝灯。

(二) 尼康双目显微镜操作规程

1. 亮度调节

打开电源开关,灯泡就会发亮,旋转亮度调节钮来调节视场亮度。

2. 瞳距调节

调节目镜筒的间距,使左右眼的视场重叠合一。

3. 放置标本切片

将切片放在载物台上,盖玻片向上,用手指将标本夹的弹片拨开,将切片固定住。

4. 对焦

(1) 将10×或4×物镜移入光路。

(2) 旋转粗调焦手轮,将载物台提升至最高点。

(3) 通过目镜进行观察, 慢慢旋转粗调焦手轮, 降低载物台。当标本像出现时停止旋转。

(4) 旋转微调焦手轮, 进行精确对焦。

(5) 当你想用高倍物镜进行观察时, 首先使用 $10\times$ 或 $4\times$ 物镜对焦, 然后更换高倍物镜, 旋转微调焦手轮进行精确对焦。

II 特殊显微镜的构造及其使用

II.1 相差显微镜

一、实验目的

掌握相差显微镜的原理、构造及其使用方法。

二、实验器材

普通复式显微镜, 相差显微镜附件——相差物镜、转盘聚光器、调中合轴望远镜和绿色滤色镜, 载玻片, 盖玻片, 滤纸, 活体生物样品等。

三、实验原理

在显微镜下镜检时, 视场中的样品只有在反射光的波长(颜色)和振幅(亮度)与周围介质有变化时, 方能窥见被检样品。活的样品多为无色透明, 照明光线通过这种物体时, 透射或反射光的波长和振幅都不发生改变, 所以用普通光学显微镜难以辨清活体的结构。必须借助于固定和染色等理化方法, 使样品和背景的反射或透射光在波长和振幅上发生变化, 即在颜色和亮度上有所差异, 以供识别。

相差方法应用于生物学上的主要价值在于它能对透明的活体进行直接观察, 无需采用使细胞致死的固定和染色的方法。染色给活体以有害的影响, 甚至失真。由此, 才使相差法显得异常重要。

1. 相差

相差是指同一光线经过折射率不同的介质, 其相位发生变化产生的差异。相位是指在某一时间上, 光的波动所达到的位置。

一般由于被检物体(如不染色的细胞)所能产生的相差的差别太小, 我们的眼睛是很难分辨出这种差别的。只有在变相差为振幅差(明暗之差)之后, 才能被分辨。

当光波通过两种折射率不同的物质时, 如空气→水, 或由空气→玻璃, 其波长、振幅和相位皆有不同的变化。例如: 光波分别通过 1 cm 厚的水和 1 cm 厚的玻璃时, 由于两者折射率不同, 通过它们的光波在相位上产生一定的差异。通过玻璃的光波相位落后, 因为玻璃的密度和折射率比水大。所以, 光波的波长和频率都小于水。

相差决定于光波所通过介质的折射率之差及其厚度, 等于折射率与厚度的乘积之差(即光程之差), 介质越厚或折射率越大, 光波减速也越大。

相差显微镜就是利用被检物的光程之差进行镜检的。

2. 衍射与干涉

用肉眼看不到的相差，只要利用衍射和干涉现象，把相差变为明暗的振幅差，就能看到。

(1) 衍射

波在同一均匀媒质里传播是沿直线方向进行的，如果在它传播的方向上，遇到迎面挡住的孔或障碍物不比它的波长大得多，这时波就会明显地绕到障碍物后面或孔的外面去（传播路线发生了弯曲），这种现象叫波的衍射。

光也有衍射。光通过大小同光的波长的相差不大的细小物体时，也要发生衍射。

(2) 干涉

在同一种媒质里传播的两列波，如果它们的频率和波长相同，在两列波相交的区域里，由于叠加的结果，每一点的合振幅都是一定的，并且出现振动加强和振动减弱，这就是波的干涉。

光也发生干涉。光波通过小颗粒的物体后产生直射光（S）和衍射光（D），衍射光的光波振幅小，相位滞后。在光学系统中，这种直射光和衍射光相遇或光的叠加，振幅发生变化，光线或明或暗，就是光的干涉现象。

如果物体粒子是折射率稍大于周围媒质的极小的透明体时，由于光程（折射率和厚度的乘积）比较大，所以通过粒子的光比周围的光在相位上有所推迟。这是因为被检粒子的衍射光相位比直射光相位大约迟 $1/4$ 波长的缘故。若是在直射光的通过点和大部分的衍射光的通过面放置吸收光的物质或推迟相位的物质时，就能分别改变直射光和衍射光的相位和振幅。

如果把直射光相位推迟 $1/4$ 波长，使之与衍射光保持同一相位，合成波（P）等于直射光与衍射光振幅之和，即 $P = S + D$ ，则振幅加大，亮度提高。相反，把衍射光相位推迟 $1/4$ 波长，两者的相差变成 $1/2$ 波长，合成波的振幅等于两波的振幅差，即 $P = S - D$ ，这时亮度要减弱、变暗。光线的相位肉眼是看不到的，但是利用衍射和干涉的现象把相位差变成振幅差（明暗反差）就能用肉眼识别。图1-2表示直射光（S 细线）和衍射光（D 虚线）干涉的现象。D 的相位比 S 被推迟 $1/4$ 波长。合成波（P 粗线）由 S 与 D 两者干涉而生成，形成被检物体的像，振幅与 S 相同，相位稍推迟。

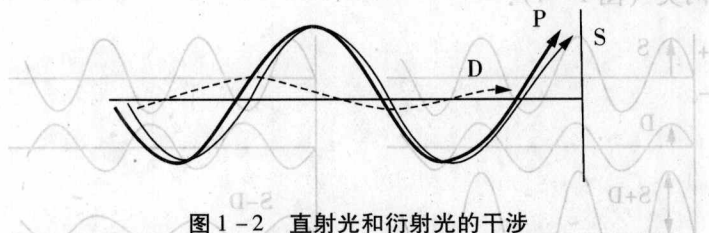


图 1-2 直射光和衍射光的干涉
S: 细线，直射光；D: 虚线，衍射光；P: 粗线，合成波

3. 相板的作用

为了达到相差效应，在相差显微镜的物镜中，装有由光学玻璃制成的相板（phase plate）。在圆形相的平面上，有一圈与周围（里外）相板厚度不同的或凸凹的圆环。其结构如图1-3。

(1) 组成

相板分两部分：

①共轭面 (conjugate area)：通常为环状，是通过直射光的部分。其环是凸起的，也可能是凹陷的。

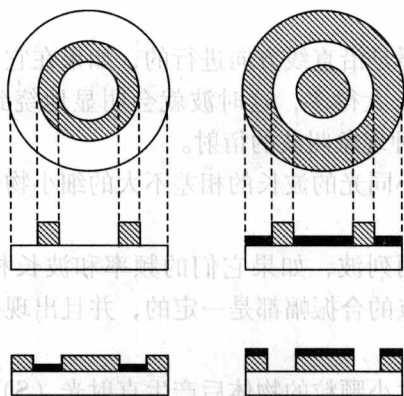


图 1-3 相板的种类及构造

左上：吸收直射光的明反差相板平面和剖面图；

左下：吸收直射光的暗反差相板剖面图；

右上：吸收衍射光的明反差相板平面和剖面图；

右下：吸收衍射光的暗反差相板剖面图；

黑色：吸收光线层；浅色：推迟相位层；白色：玻璃。

②补偿面 (complementary area)：共轭面内外两侧部分，是通过衍射光的部分。

在相板的共轭面或补偿面上，涂有改变光波相位或吸收光线的物质。当光线通过时，使光波的相位或振幅改变，从而达到不同的目的与观察效果。利用相板把光波相位推迟，振幅改变。相板的作用，除推迟直射光和衍射光的相位之外，还有吸收光、从而使亮度改变的作用。物镜的后焦点位于透镜中间而相板位于物镜的后焦面上，所以，相板也安装在透镜中间。

(2) 种类

相板的种类比较多。因为对光的吸收率高低不同，所以产生不同的反差效果。从反差上大致可分下列两类 (图 1-4)：

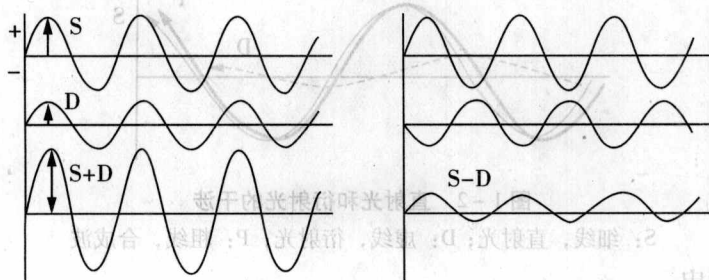


图 1-4 明反差与暗反差

左：明反差，直射光 (S) 与衍射光 (D) 相位相同，两波干涉结果合成波 $P = S + D$ ，振幅加大；

右：暗反差，直射光与衍射光相位相差 $1/2$ 波长，两波干涉结果合成波 $P = S - D$ ，振幅变小。

①明反差 (bright contrast) 或负反差 (negative contrast)：是指在相差显微镜的视场

中,物像亮度大于背景亮度的现象。在被检物体的折射率大于媒质时,直射光被相板的共轭面(因为在共轭面上涂有改变相位和吸收光线的物质)推迟 $1/4$ 波长,同时吸收 80% ~ 90%,振幅变小,致使仅由直射光照射的背景变暗。通过补偿面的衍射没有变化,由于直射光推迟 $1/4$ 波长,两者(直射光与衍射光)有完全相同的相位,合成波 P 等于直射光 S 与衍射光 D 之合,即 $P = S + D$,故振幅加大。物像是这两种波的合成波造成,即物像等于 P ,所以比只有直射光照射的背景亮得多。

②暗反差 (dark contrast) 或正反差 (positive contrast): 是指在相差显微镜的视场中,背景亮度大于物像亮度的现象。与明反差相反,把通过补偿面(因为在相板的补偿面上涂有改变光波相位的物质)的衍射光推迟 $1/4$ 波长,使衍射光与直射光的相位相差 $1/2$ 波长,同时,直射光在共轭面(上涂吸光物质)被部分吸收。由于两者在像点相互干涉的结果,使合成波 ($P = S - D$) 振幅变小,被检物像的影像比背景显著变暗。

根据上述原理所制成的显微镜便是相差显微镜,聚光镜下面装有环状光阑,物镜后焦面装有相板。

4. 相差显微镜的光路与成像

相差显微镜的照明光束由转盘聚光器环状光阑的环状孔射入聚光镜,透射载物台上的被检样品。经样品后,入射光除透射的直线光外,同时产生衍射光。衍射光的振幅较小,相位滞后。直射光和衍射光进入物镜,前者由环状的共轭面、后者由较大的补偿面透过相板,并相互干涉造像。样品的影像由直射光 (S) 和衍射光 (D) 经干涉后的合成波 (P) 造成,即 $P = S \pm D$;背景仅由直射光形成。由于直射光和衍射光两种光波的相位差异不同造成不同的反差效果,或明反差或暗反差不等,视所用物镜的相板类别而定。成像光束由物镜射入目镜,在目镜的视场光阑处再次放大,并由出射光瞳射出目镜。

5. 装置

相差显微镜不同于普通光学显微镜,在装置上有四种必不可缺的部件:相差物镜、具有环状光阑的转盘聚光器、合轴调中望远镜和绿色的滤色镜。

(1) 相差物镜 (phase contrast objective)

相差物镜是显微镜特有的重要装置。在相差物镜内的后焦面上装有种类不同的相板。相板由于前述的作用,造成视场中被检样品影像与背景不同的明暗反差,各具不同的效果。因物镜内相板种类或构成的不同,物镜在明暗反差上可区分为两大类,即明反差 (B) 或负反差 (N) 物镜和暗反差 (D) 或正反差 (P) 物镜。物镜的反差类别,用英文字母 B 、 N 、 D 或 P 标志在物镜外壳上,并兼有高 H (High)、中 M (Medium) 和低 L (Low) 等三种不同的反差。有的相差物镜用 ph 字样标示。

同一反差类别的物镜,依放大率的不同,又可分为 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ 数种,因此,相差物镜种类颇多,一套可多达二十余种。

相差物镜多为消色差物镜或平场消色差物镜 (PL)。

(2) 转盘聚光器 (turret condenser)

位于镜台之下、普通聚光器的位置上,由聚光镜和环状光阑 (annular diaphragm) 构成。环状光阑位于聚光镜之下,是一种特殊的光阑装置,由大小不同的环状通光孔构成,不同规格的通光孔 (环状光阑) 装配在一个可旋转的转盘上,按需要调转使用 (图 1-5)。环状光阑的环宽与直径各不相同,与不同放大率的相差物镜内的相板相匹配,

不可滥用。转盘前端朝向使用者一面有标示窗(孔),转盘上的不同部位标有0、1、2、3和4或0、10、20、40和100字样,通过标示窗显现。“0”表示非相差的明视场的普通光阑。1或10、2或20、3或40和4或100,表示与相应放大率的相差物镜相匹配的不同规格的环状光阑的标志。通过手动转入的标示窗内之数字,表示该数字所代表的环状光阑已进入光路。

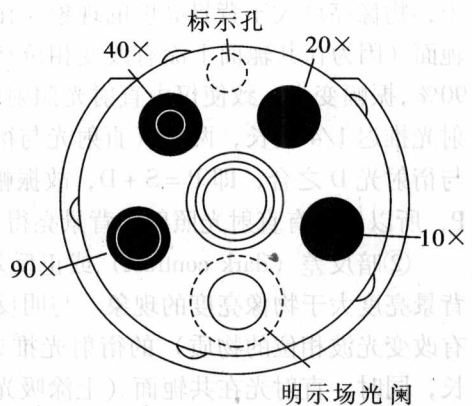


图1-5 转盘聚光器的构造

(3) 合轴调中望远镜 (centering telescope)

合轴调中望远镜简称CT,又名合轴调中目镜。它是眼透镜,可行升降调节,具有较长的焦距。镜筒较长,其直径与观察目镜相同。它的功用仅作为环状光阑的环孔(亮环)与相差物镜相板的共轭面环孔(暗环)的调中合轴与调焦之用。相差显微镜使用时,转盘聚光器的环状光阑与相差目镜必须匹配,且环状光阑的孔环与相差物镜相板共轭面的环孔在光路中要准确合轴,并完全吻合或重叠,以保证直射光和衍射光各行其路,使成像光线的相位差转变为可见的振幅差。但是,镜体的光路中前述两环的影像较小,一般目镜难以辨清,不能进行调焦与合轴的操作,非借助合轴调中望远镜不可。

(4) 绿色滤色镜 (green filter)

相差物镜的种类,从色差消除情况来分,多属消色差物镜 (achromatic objective) 或 PL 物镜。消色差物镜的最佳清晰范围的光谱区为 510 ~ 630 nm。欲提高相差显微镜的性能最好以波长范围小的单色光照明,即以物镜最佳清晰范围的波长的光线进行照明。所以,使用相差物镜时,在光路上加用透射光线波长为 500 ~ 600 nm 左右的绿色滤色镜,使照明光线中的红光和蓝光被吸收,只透过绿光,可提高物镜的分辨能力。该滤色镜兼有吸热的作用,以利活体观察。

四、实验步骤

相差显微镜的使用,较之普通显微镜要复杂些,但亦易于掌握,按下列过程进行操作。

1. 相差装置的安装

如前所述,相差显微镜区别于普通光学显微镜的装置主要有相差物镜、转盘聚光器、合轴调中望远镜和绿色滤色镜四种部件。使用时将这些部件调换安装在同型号普通光学显微镜上,即成为相差显微镜。

(1) 相差物镜的调换安装:从物镜转换器上拆下普通物镜,旋入相差物镜,与普通目镜配套使用。

(2) 转盘聚光器的调换安装:旋转聚光器升降螺旋,把普通明视场聚光器降至最低位,旋松固紧螺丝,卸下聚光器。把转盘聚光器安放到相应位置上,旋紧固紧螺丝,转动聚光器升降螺旋,使聚光器升至最高位置。转盘聚光器的标示孔,朝向操作者。此时,转盘聚光器上面的聚光镜部分,进入光路;下面的环状光阑转盘,可视需要转动使用,把与物镜匹配的环孔旋入光路,使之处于转盘聚光镜下。

(3) 绿色滤色镜的安装: 把绿色滤色镜放入镜座的滤色镜架上。

2. 聚光器调中

转盘聚光器调换安装后, 要进行合轴调中, 使聚光器的光轴与显微镜的主光轴合一。其步骤如下:

- (1) 把转盘聚光器的环状光阑调至“0”位, 明视场照明的普通可变光阑进入光路。
- (2) 旋转聚光器升降螺旋, 聚光器升至最高位。
- (3) 接通照明光源, 使视场明亮。
- (4) 把被检样品放到载物台上, 用低倍(4×)物镜聚焦。
- (5) 缩小镜座上的视场光阑开孔, 至最小。
- (6) 从目镜观察, 在暗视场中可见一缩小的、明亮的、多角形的视场光阑图像。
- (7) 转动转盘聚光器的两个调中杆, 推动聚光器, 把视场中的明亮的多角形的视场光阑图像, 调至视场中央。

(8) 开放视场光阑至视场同大, 视两者周边是否完全重合; 否则, 复用调中螺杆, 使聚光器精确调中。

3. 相板圆环与环状光阑圆环的合轴调中

相差物镜的后焦面装有相板。按物镜放大率与反差效果的不同, 相板圆环(共轭面)的大小与结构亦不同。转盘聚光器的环状光阑为一系列的透光的、不同大小的明亮环孔, 与不同放大率的物镜相应。使用时严格匹配, 当物镜更换时, 环状光阑亦作相应的更换或调整。

在视场中观察所见, 环状光阑为一明亮的圆环, 而相板的圆环为一暗环。互相匹配的明环与暗环大小一致。在使用时两者要合轴, 互相重叠。两环的重叠, 须通过合轴调节方能取得。其方法如下:

(1) 相差物镜与环状光阑的匹配: 正确的匹配取决于所用物镜放大率。例如, 当使用40×相差物镜时, 环状光阑转向 ph3 或 40 位, 使相应的环状光阑进入光路。

(2) 把 CT 放入目镜筒: 从目镜筒取出一个目镜, 换入调中合轴望远镜(CT)。CT 为一眼透镜, 也是可行升降调节的望远目镜, 专为观察视场中明环与暗环图像之用。用一般目镜看不见两环的清晰图像。CT 在使用前眼透镜应处于最低位, 即 CT 为最短小的状态。

(3) 明环与暗环的聚焦: 一手固定位于目镜筒中的 CT 镜筒, 使其透镜位置不能上移, 另一手逆时针转到 CT 上部可调的眼透镜部分。转动的同时, 通过 CT 向现场中观察, 即边旋转边观察初始, 两环可能为模糊的图像, 继续转动 CT 目镜可调部分至清晰地窥见明环与暗环为止。

(4) 明环与暗环的调中重叠: 相板的暗环是固定不动的, 处于光路之中。暗环的中心, 即显微镜光轴的中心。环状光阑的亮环可调节移动。转盘聚光器环状光阑的位置因聚光器的可调, 其中心位置往往偏离光轴轴心, 需调整, 使其归中。环状光阑的调中装置或部件, 因厂家或型号的不同而有别。如 OLYMPUS BH₂-PC 型相差显微镜, 环状光阑调中装置为位于转盘聚光器两侧的两个伸丝自如的调中螺杆, 用以操纵改换环状光阑的方位, 达到调中; 而 Nikon FIVORPHOT 型显微镜的相差装置, 其环状光阑的调中部件为位于转盘聚光器表面的可向任一方向滑动的环状钮。调中时, 手捏调中装置, 移动明环, 使之与暗环合一。两环调中过程始终在通过 CT 的观察下进行。

在调节过程中,如亮环比暗环小,并位于暗环内侧时,应降低聚光器位置,使亮环放大。若亮环大于暗环时,应提升聚光器,使亮环缩小。如聚光器已升至最顶点还不能完全重合,可能是载玻片过厚之故。

(5) 回装观察目镜:待相差物镜的暗环与环状光阑的亮环调中、重叠后,从目镜筒中取出CT,放回观察用的接目镜,以便镜检观察。

4. 相差物镜的选择

相差物镜有不同倍率、不同反差类别和反差程度之分。相差物镜的反差类别和反差程度以及放大倍数,皆用英文字母和数字标示在物镜外壳上。例如:

$20 \times \text{PH} = 20$ 倍,正反差,反差程度高。

$20 \times \text{PM} = 40$ 倍,正反差,反差程度中等。

$100 \times \text{PL} = 100$ 倍,正反差,反差程度低。

$40 \times \text{NH} = 40$ 倍,负反差,反差程度高。

$40 \times \text{NM} = 40$ 倍,负反差,反差程度中等。

$100 \times \text{NL} = 100$ 倍,负反差,反差程度低。

$100 \times \text{DH} = 100$ 倍,暗反差,反差程度高。

$40 \times \text{DM} = 40$ 倍,暗反差,反差程度中等。

$20 \times \text{DL} = 20$ 倍,暗反差,反差程度低。

$10 \times \text{BH} = 10$ 倍,明反差,反差程度高。

$20 \times \text{BM} = 20$ 倍,明反差,反差程度中等。

$40 \times \text{BL} = 40$ 倍,明反差,反差程度低。

相差镜检时,依被检样品的种类、结构和反差程度的不同,而确定应选用相差物镜的种类。这不存在死硬的规定,可依观察者的习惯和爱好而变。一般来说,相差物镜的应用范围如表1-1。

就某一具体被检物体来说,适于明反差还是适于暗反差,难以定论。通常用哪一种相差物镜都能得到清晰的像,只是有的物镜更好些而已,因此可任意选择。有的样品只适于某一种相差物镜。暗反差物镜对习惯于明视场镜检者很适宜。当与染色标本进行比较或进行测定以及加强半透明物体的反差时,多用暗反差;而计算数量或观察物体运动以及研究极小的样品时,多使用明反差。

表1-1 相差物镜的应用范围

字母	反差	应用
P	正	观察细胞或细胞核的内部结构
N	负	观察微小的物体如孢子、鞭毛和活的样品等
H	高	当样品反差程度较低时
L	低	当样品反差程度较高时
M	中	当样品反差程度为中等时

总之,在相差镜检时,于诸多的相差物镜中选一物镜,绝非易事。除参考上表所列应用范围外,最佳方法是通过各种类型的相差物镜进行实际镜检测定,找出最宜相差物镜。