

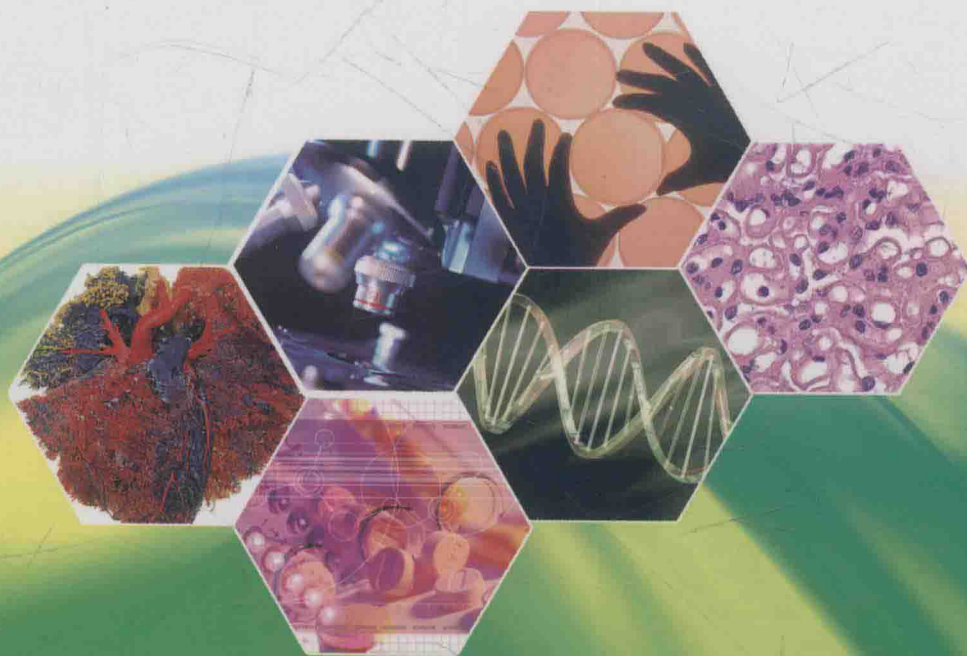


普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

医学细胞生物学实验

主编 易 岚 李国庆



科学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波

编写委员会总主编 姜志胜

医学细胞生物学实验

主 编 易 岚 李国庆

副主编 贺庆芝 张树冰 杨南扬 秦志峰

主 审 刘艳平 王宗保

编 者 (按姓氏拼音排序)

贺庆芝 胡劲松 李 杰 李 鹏

李国庆 刘 俊 刘慕君 刘艳平

刘迎福 彭翠英 秦志峰 石松林

孙 敬 王宗保 谢红艳 杨 超

杨露青 杨南扬 杨晓燕 易 岚

殷 杰 张鹏飞 张树冰 郑济芳

周军媚 周叶芳 朱允华

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话: 010-64030229; 010-64034315; 13501151303 (打假办)

内 容 简 介

本书是医学类本科学生的专业基础课教材。全书共分为验证性实验、综合性实验和设计性实验三个部分,共 35 个实验,实验内容涉及显微镜技术、细胞的形态结构、细胞化学、细胞分裂、细胞培养技术、细胞化学成分的分、细胞周期检测、细胞分化凋亡鉴定等;既具有教材的基础性与实用性,又具有一定的科学性和先进性。本书除供医学高等院校学生使用外,还可供综合大学、师范院校及农、林院校细胞生物学实验教学和参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验 / 易岚, 李国庆主编, —北京: 科学出版社, 2016.8
普通高等教育“十三五”规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-049197-8

I. ①医… II. ①易… ②李… III. ①医学-细胞生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 146979 号

责任编辑: 李 植 / 责任校对: 邹慧卿
责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

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>

大厂书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2016 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016 年 8 月第一次印刷 印张: 8 1/2

字数: 187 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会

主任委员 文格波

副主任委员 姜志胜 吴移谋 廖端芳

委 员 (以姓氏笔画排序)

王 韵	王宗保	牛亦农	龙双涟
田 英	刘貽尧	刘艳平	宇 丽
严 杰	李 和	肖建华	肖献忠
何庆南	余 平	宋 健	张新华
陈 熙	罗学港	周国民	贺修胜
秦晓群	龚永生	傅松滨	管又飞

编写委员会

总 主 编 姜志胜

副 总 主 编 田 英 陈 熙 贺修胜

编 委 (以姓氏笔画排序)

万 炜	王汉群	尹 凯	甘润良
龙石银	乔新惠	刘 俊	刘录山
向宇燕	李严兵	李国庆	李忠玉
李美香	杨秋林	张 艳	屈丽华
易 岚	易光辉	胡四海	赵飞骏
桂庆军	凌 晖	唐志晗	梁 瑜
彭翠英	谭健苗		

秘 书 梁 瑜 唐志晗

序 一

近年来,教育部卫生部等多部委紧密部署实施本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划,把强化实践教学环节作为重要内容和重点要求,进一步凸显了医学实践性很强的属性,对切实加强医学实验教学提出了更高要求,指引着我国医学实验教学进入全面深化改革阶段。

高校牢固树立以学生为本、目标导向和持续改进的教育理念,积极创新和完善更加有利于培养学生实践能力和创新能力的实验教学体系,建设高素质实验教学队伍和高水平实验教学平台,以促进和保证实验教学水平全面提高。为此,南华大学医学院协同国内多所高校对第一版《全国高等院校医学实验教学规划教材》进行了修订和拓展。第二版教材涵盖了解剖学、显微形态学、医学免疫学、病原生物学、机能学、临床技能学、生物化学、分子生物学、医学细胞生物学、医学遗传学的实验教学内容,全书贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力的全面培养,不失为一套高质量的精品教材。

愿《全国高等院校医学实验教学规划教材》的出版为推动我国医学实验教学的深化改革和持续发展发挥重要作用。

教育部高等学校基础医学类专业教学指导委员会主任委员
中国高等教育学会基础医学教育分会理事长

2015年12月



序 二

随着本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划的实施,高等医学院校迎来了进一步加强医学实验教学、提高医学实验教学质量的大好时机,必须积极更新医学实验教学理念,创新实验教学体系、教学模式和教学方法,整合实验教学内容,应用实验教学新技术新手段,促进医学人才知识、技能和素质全面协调发展。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》编审委员会和编写委员会与时俱进,积极推进实验教学改革的深化,组织相关学科专业的专家教授,在第一版的基础上,吸收了南华大学等多个高校近年来在医学实验教学方面的改革新成果,强调对学生基本理论、基础知识、基本技能以及创新能力的培养,打破现行课程框架,构建以综合能力培养为目标的新型医学实验教学体系,修订并拓展了这套实验教学规划教材。第二版教材共十四本,包括:《系统解剖学实验》《局部解剖学实验》《显微形态学实验(组织与胚胎学分册)》《显微形态学实验(病理学分册)》《病原生物学实验(医学微生物学分册)》《病原生物学实验(人体寄生虫学分册)》《医学免疫学实验》《机能实验学》《临床基本技能学(诊断技能分册)》《临床基本技能学(外科基本技能分册)》《生物化学实验与技术》《分子生物学实验》《医学细胞生物学实验》《医学遗传学实验》。

本套规划教材的编写,借鉴国内外同类实验教材的编写模式,内容上依据医学实验体系进行重组和有机融合,按照医学实验教学的逻辑和规律进行编写,并注重知识的更新,反映学科的前沿动态,体现教材的思想性、科学性、启发性、先进性和实用性。

本套规划教材适用对象以本科临床医学专业为主,兼顾麻醉学、口腔医学、医学影像、护理学、预防医学、医学检验、卫生检验、药学、药物制剂、生物科学、生物技术等专业实验教学需求,各层次各专业学生可按照其专业培养特点和要求,选用相应的实验项目进行教学与学习。

本套规划教材的编写出版,得到了科学出版社和南华大学以及有关兄弟院校的大力支持,得到了基础医学湖南省重点学科资助,凝聚了各位主编和全体编写、编审人员的心血和智慧,在此,一并表示衷心感谢。

由于医学实验教学模式尚存差异,加上我们的水平有限,本套规划教材难免存在缺点和不当之处,敬请读者批评指正。

总主编
2015年12月



前 言

细胞生物学是研究和揭示细胞基本生命活动规律的科学，既是生命科学的重要基础学科，也是前沿学科。细胞的研究既是生命科学的出发点，又是生命科学微观和宏观研究的交叉点。细胞生物学与分子生物学、发育生物学、遗传学等其他学科相互渗透与整合，成为当前生命科学研究中发展最快的领域之一。医学细胞生物学课程是高等学校医学类、生物科学类各专业的基础课程之一，是一门实验性很强的课程。生命科学领域及医学领域的许多重大发现和进步与细胞生物学实验技术的不断创新、发展是分不开的。实验是科学理论的实践，通过实验可以巩固和加深对细胞生物学知识和理论的理解，同时可获得感性认识。学生在实验中既可接受一定的细胞生物学基本实验技能的训练，又培养了实事求是的科学态度和独立工作能力，从而可以掌握观察问题和分析解决问题的方法，为生命科学与医学的后续课程学习打下了坚实的基础。

本书是编者根据多年的教学经验和大量参考国内外相关资料编写而成。鉴于此书是医学类、生物科学类本科学生的专业基础课教材，同时也考虑到又能作为相关人员的参考书，因此，既需考虑教材的基础性与实用性，又需考虑到其内容具有一定的科学性和先进性。本书实验内容涉及显微镜技术、细胞的形态结构、细胞化学、细胞分裂、细胞培养技术、细胞化学成分分离、细胞周期检测、细胞分化凋亡鉴定等。根据创新性教学的需要，有些实验内容具有一定的综合性和设计性。

本书供综合大学、师范院校、医科院校及农、林院校细胞生物学实验教学之用，部分内容可作为细胞工程实验教学之用。由于各个学校和各个专业的教学要求和具体条件有所差别，使用本教材时，各学校可以根据具体条件自由选择，灵活掌握。

虽然编者为本书的编写付出了极大努力，但由于业务水平和工作经验所限，教材中难免仍有不足之处，敬请专家和读者指正。

易 岚 李国庆

2016年5月于南华大学

目 录

第一部分 验证性实验	1
实验 1 普通光学显微镜的构造与使用	1
实验 2 相差显微镜的原理与使用	7
实验 3 荧光显微镜的原理与使用	11
实验 4 透射电子显微镜的原理与使用	14
实验 5 扫描电子显微镜的原理与使用	17
实验 6 生物绘图法	21
实验 7 细胞的基本形态与结构	22
实验 8 细胞的化学成分	24
实验 9 细胞骨架的光学显微镜观察	28
实验 10 细胞的超微结构	30
实验 11 染色体核仁组织区的显示	35
实验 12 线粒体的活体染色与观察	37
实验 13 液泡系的活体染色与观察	39
实验 14 细胞核与线粒体的分离与观察	41
实验 15 叶绿体的分离与荧光观察	44
实验 16 细胞有丝分裂标本的制备与观察	46
实验 17 减数分裂标本的制备与观察	49
实验 18 动物细胞的原代培养	55
实验 19 动物细胞的传代培养	61
实验 20 动物细胞的冻存、复苏与运输	65
实验 21 细胞周期的同步化	67
实验 22 细胞电融合	70
实验 23 细胞化学融合	74
实验 24 膜蛋白质的分离与鉴定	77
实验 25 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡	82
第二部分 综合性实验	86
实验 26 细胞器分级、分离与鉴定	86

实验 27 动植物染色体标本的制作与观察	89
实验 28 细胞计数、生长曲线的绘制及细胞增殖活力检测	94
实验 29 小鼠腮腺干细胞的分离与培养	98
实验 30 细胞衰老的诱导与观察	101
实验 31 DADS 诱导 HL-60 细胞凋亡的形态特征与生化特征观察	104
第三部分 设计性实验	111
实验 32 利用细胞遗传毒理学方法进行安全毒理评价和环境检测	111
实验 33 锌对肿瘤细胞周期的影响	113
实验 34 药物诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡检测	120
实验 35 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定	122
参考文献	124

第一部分 验证性实验

实验 1 普通光学显微镜的构造与使用

一、实验目的

- (1) 了解普通光学显微镜的构造及成像原理。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。
- (3) 初步了解光学显微镜的维护方法。

二、实验原理

普通光学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。其基本成像原理是:目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜,被检标本置于聚光器与物镜之间,物镜可使标本在物镜的上方而形成一个倒立的放大实像(倒像)。目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上,形成一个直立的实像(正像)。显微镜中放大的倒立的虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的,该虚像看起来好像在离眼睛 250mm 处(图 1-1)。

三、实验仪器、材料和试剂

1. 器材 普通光学显微镜、擦镜纸。
2. 试剂 镜头清洗剂、香柏油或油镜专用油等。
3. 材料 文字装片或毛发装片、血涂片。

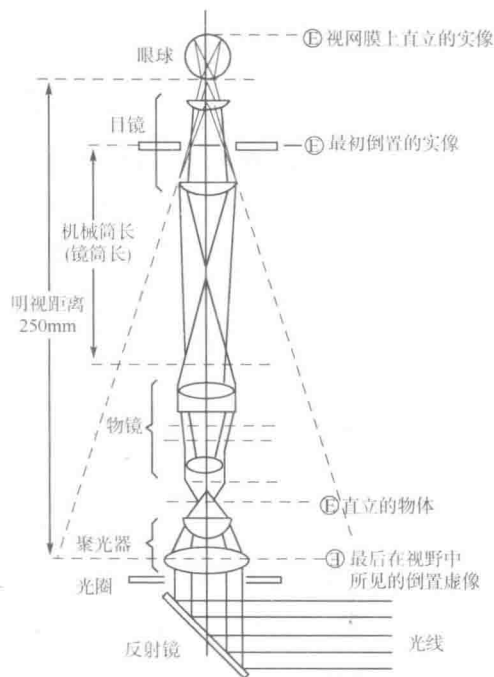


图 1-1 光学显微镜的放大原理及光路图(引自王金发等, 2004)

四、方法与步骤

(一) 普通光学显微镜的基本构造

光学显微镜主要由三部分组成:机械部分、照明部分和光学部分(图 1-2)。

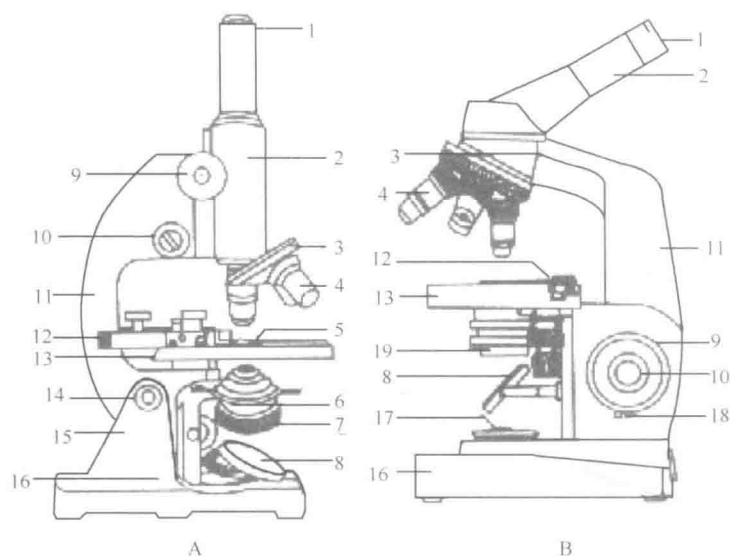


图 1-2 普通光学显微镜的结构示意图(引自章静波等, 2004)

A. 单目显微镜; B. 双目显微镜

1. 目镜; 2. 镜筒; 3. 物镜转换器; 4. 物镜; 5. 通光孔; 6. 聚光器; 7. 光圈; 8. 反光镜; 9. 粗调节器; 10. 细调节器; 11. 镜臂; 12. 移片器; 13. 载物台; 14. 倾斜关节; 15. 镜柱; 16. 镜座; 17. 照明装置; 18. 粗调限位环凹柄; 19. 滤光片

1. 机械部分 显微镜的机械部分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。主要有镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器与调焦装置等组成。

(1) 镜座: 作用是支撑整个显微镜, 装有反光镜, 有的还装有照明光源。

(2) 镜柱: 镜座上面直立的短柱, 连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂: 作用是支撑镜筒和载物台, 分固定、可倾斜两种。

(4) 镜筒: 上端放置目镜, 下端连接物镜转换器。分为固定式和可调节式两种。机械筒长(从目镜管上缘到物镜转换器螺旋口下端的距离称为镜筒长度或机械筒长)不能变更的称作固定式镜筒, 能变更的称作调节式镜筒, 新式显微镜大多采用固定式镜筒, 国产显微镜也大多采用固定式镜筒, 国产显微镜的机械筒长通常是 160mm。

安装目镜的镜筒, 有单筒和双筒两种。单筒又可分为直立式和倾斜式两种, 双筒则都是倾斜式的。其中双筒显微镜, 两眼可同时观察以减轻眼睛的疲劳。双筒之间的距离可以调节, 而且其中有一个目镜有屈光度调节(即视力调节)装置, 便于两眼视力不同的观察者使用。

(5) 载物台(又称工作台、镜台): 作用是安放载玻片, 形状有圆形和方形两种, 其中方形的面积为 $120\text{mm} \times 110\text{mm}$ 。中心有一个通光孔, 通光孔后方左右两侧各有一个安装压片夹用的小孔。分为固定式与移动式两种。有的载物台的纵横坐标上都装有游标尺, 一般读数为 0.1mm , 游标尺可用来测定标本的大小, 也可用来对被检部分做标记。

(6) 物镜转换器: 固定在镜筒下端, 有 3~4 个物镜螺旋口, 物镜应按放大倍数高低顺序排列。旋转物镜转换器时, 应用手指捏住旋转碟旋转, 不要用手指推动物镜, 因时间长容易使光轴歪斜, 使成像质量变坏。

(7) 调焦装置: 显微镜上装有粗调节器(粗准焦螺旋)和细调节器(细准焦螺旋)。有的显微镜粗准焦螺旋与细准焦螺旋装在同一轴上, 大螺旋为粗准焦螺旋, 小螺旋为细准焦螺旋; 有的则分开安置, 位于镜臂的上端较大的一对螺旋为粗准焦螺旋, 其转动一周,

镜筒上升或下降 10mm。位于粗准焦螺旋下方较小的一对螺旋为细准焦螺旋，其转动一周，镜筒升降值为 0.1mm，细准焦螺旋调焦范围不小于 1.8mm。

2. 照明部分 安装在载物台下方，包括反光镜（或照明光源）、聚光镜、光圈。

（1）反光镜（或照明光源）：是一个可以随意转动的双面镜，一面为平面，一面为凹面，其作用是将从任何方向射来的光线经通光孔反射上来。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。观察完毕后，应将反光镜垂直放置。电光源普通显微镜没有反光镜，一般在镜座内安装有照明装置，光线的强弱由底座上或镜臂上的光亮调节钮控制。

（2）聚光器：也称集光器。位于标本下方的聚光器支架上。它主要由聚光镜和光圈组成。其中，聚光镜可分为明视场聚光镜（普通显微镜配置）和暗视场聚光镜。

数值孔径（NA）是聚光镜的主要参数，最大数值孔径一般是 1.2~1.4，数值孔径有一定的可变范围，通常刻在上方透镜边框上的数字代表最大的数值孔径，通过调节下部可变光阑的开放程度，可得到此数字以下的各种不同的数值孔径，以适应不同物镜的需要。有的聚光镜由几组透镜组成，最上面的一组透镜可以卸掉或移出光路，使聚光镜的数值孔径变小，以适应低倍物镜观察时的照明。

聚光镜的作用相当于凸透镜，起会聚光线的作用，以增强标本的照明。一般把聚光镜的聚光焦点设计在它上端透镜平面上方约 1.25mm 处（聚光焦点正要观察的标本上，载玻片的厚度为 1.1mm 左右）。

光圈也称可变光阑，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（观察完毕后，应将光圈调至最大）。

在可变光阑下面，还有一个圆形的滤光片托架。滤光片安装在光源和聚光器之间。作用是让所选择的某一波段的光线通过，而吸收掉其他的光线，即改变光线的光谱成分或削弱光的强度。

3. 光学部分

（1）物镜：是决定显微镜性能的最重要部件，安装在物镜转换器上，接近被观察的物体，又称接物镜。物镜根据使用条件的不同可分为干燥物镜和浸液物镜；其中浸液物镜又可分为水浸物镜和油浸物镜（常用放大倍数为 90~100 倍）。根据放大倍数的不同可分为低倍物镜（10 倍以下）、中倍物镜（20 倍左右）和高倍物镜（40~65 倍）。

（2）目镜：因为它靠近观察者的眼睛，因此也称接目镜，安装在镜筒的上端。通常目镜由上下两组透镜组成，上面的透镜称作接目透镜，下面的透镜称作会聚透镜或场镜。上下透镜之间或场镜下面装有一个光阑（它的大小决定了视场的大小），因为标本正好在光阑面上成像，可在这个光阑上粘一小段毛发作为指针，用来指示某个特点的目标；也可在其上面放置目镜测微尺，用来测量所观察标本的大小。目镜的长度越短，放大倍数越大（因目镜的放大倍数与目镜的焦距成反比）。目镜是将已被物镜放大的、分辨清晰的实像进一步放大，达到人眼能容易分辨清楚的程度。常用目镜的放大倍数为 5~16 倍。

（二）普通光学显微镜的性能和质量

1. 目镜与物镜的关系 物镜已经分辨清楚的细微结构，假如没有经过目镜的再放大，达不到人眼所能分辨的大小，那就看不清楚；但物镜所不能分辨的细微结构，虽然经过高倍目镜的再放大，也还是看不清楚，所以目镜只能起放大作用，不会提高显微镜的分辨率。

有时虽然物镜能分辨开两个靠得很近的物点,但由于这两个物点的像的距离小于眼睛的分辨距离,还是无法看清。所以,目镜和物镜既相互联系,又彼此制约。

2. 放大倍数 显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

放大倍数是指眼睛看到像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。例如,放大倍数为 $100\times$,指的是长度是 $1\mu\text{m}$ 的标本,放大后像的长度是 $100\mu\text{m}$,要是以面积计算,则放大了 10 000 倍。

3. 数值孔径 也称镜口率,简写为 NA 或 A,是物镜和聚光器的主要参数,与显微镜的分辨力成正比。干燥物镜的数值孔径为 $0.05\sim 0.95$,油浸物镜(香柏油)的数值孔径为 1.25。

4. 工作距离 是指当所观察的标本最清楚时物镜的前端透镜下面到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关,物镜的焦距越长,放大倍数越低,其工作距离越长。例如,10 倍物镜上标有 $10/0.25$ 和 $160/0.17$,其中 10 为物镜的放大倍数;0.25 为数值孔径;160 为镜筒长度(单位 mm);0.17 为盖玻片的标准厚度(单位 mm)。10 倍物镜有效工作距离为 6.5mm,40 倍物镜有效工作距离为 0.48mm。

5. 分辨力 也称分辨率或分辨本领。分辨力的大小是用分辨距离(所能分辨开的两个物点间的最小距离)的数值来表示的。在明视距离(25cm)之处,正常人眼所能看清相距 0.073mm 的两个物点,这个 0.073mm 的数值,即为正常人眼的分辨距离。显微镜的分辨距离越小,即表示它的分辨力越高,也就是表示它的性能越好。

显微镜分辨力的大小是由物镜的分辨力来决定的,而物镜的分辨力又是由它的数值孔径和照明光线的波长决定的。

当用普通的中央照明法(使光线均匀地透过标本的明视照明法)时,显微镜的分辨距离为

$$d=0.61\lambda/\text{NA}$$

式中 d ——物镜的分辨距离,单位 nm。

λ ——照明光线波长,单位 nm。

NA——物镜的数值孔径。

例如,油浸物镜的数值孔径为 1.25,可见光波长范围为 $400\sim 700\text{nm}$,取其平均波长 550nm ,则 $d=270\text{nm}$,约等于照明光线波长一半。一般地,用可见光照明的显微镜分辨力的极限是 $0.2\mu\text{m}$ 。

6. 焦点深度 当把焦点对准某一物点时,不仅位于该点平面上的各个点可看得清楚,而且在平面的上下一定厚度内也能看得清楚,这个清晰部分的厚度就是焦点深度。焦深与总放大率和镜口率成反比,因此高放大率和高镜口率显微镜的焦点深度就浅,不能看到标本的全厚度,必须调节螺旋改变焦距,并仔细地从上到下进行观察。

7. 视场亮度 是指光学显微镜的整个视场的明暗程度。在使用光镜时,不更换物镜和目镜的情况下,视场亮度大,观察到的图像也就大。

(三) 显微镜的使用方法

1. 用前的准备工作

(1) 打开镜箱,右手握住镜臂,左手托住镜座,小心地把显微镜从镜箱内取出,轻轻地放在实验桌上。

(2) 检查显微镜的各部件是否完整和正常,如发现有部件损坏或出现故障,应立即停止使用,待排除故障或修复后,才能继续操作。

2. 低倍镜的使用

(1) 准备: 将显微镜放于前方略偏左侧, 必要时使镜筒倾斜(有的显微镜本身已经倾斜)以便观察。转动粗调节器, 将镜筒略升高(或将载物台下降)使物镜与载物台距离拉开。以免物镜与载物台相碰。然后旋转物镜转换器, 将低倍镜对准载物台中央的通光孔(可听到“咔哒”声)。

(2) 对光: 打开光圈, 上升聚光器, 双眼同时睁开, 以左眼向目镜内观察, 双手并用, 左手调焦, 右手移片或绘图记录, 同时调节反光镜的方向, 使视野内的光线均匀, 亮度适中。

(3) 放标本片: 标本片的盖片朝上, 将标本片放到载物台前方, 然后推到物镜下面, 用压片夹压住, 如有标本移动器, 可用上面的弹簧夹夹住标本片, 然后把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(4) 调节焦距: 从显微镜侧面注视物镜镜头, 同时旋转粗调节器, 使镜筒缓慢下降(或镜台上升), 低倍镜的镜头端与玻片间的距离约 5mm 时, 再用左眼从目镜里观察视野, 左手慢慢转动粗调节器, 使镜筒缓缓上升, 直至视野中出现物像。如物像不太清晰, 可转动细调节器, 使物像达到最清晰为止。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时, 可能由以下原因造成: ①转动调节器太快, 超过焦点, 应按上述步骤重新调节焦距。②物镜没有对正, 应对正后再观察。③标本没有放到视野内, 应移动标本片寻找观察对象。④光线太强, 尤其观察比较透明的标本或没有染色的标本时, 易出现这种现象, 应将光线调暗一些后再观察。

3. 高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤, 先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野的中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜, 用手移动转换器, 换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察, 同时微微上下转动细调节器, 直至视野内看到清晰的物像为止。

如按上述操作仍看不到物像时, 可能由下列原因造成: ①观察的部分没在视野内, 应在低倍镜下找到后, 移到视野中央, 再换高倍镜观察。②标本片放反了, 应把标本片放正后, 再按上述步骤操作。③焦距没调好, 应仔细调节焦距。

有的显微镜高倍镜与低倍镜不配套, 从低倍镜转换高倍镜时, 往往转不过来或撞坏标本, 如遇到这种情况, 可把镜筒略升高(或载物台下降), 直接用高倍镜调焦方法: 从侧面注视物镜, 调节粗调节器, 使高倍镜头下降至与标本片最短距离, 再观察目镜视野, 慢慢调节细调节器, 使镜头缓缓上升, 直至物像清晰为止。如需要更换标本片时, 应该先把镜筒升高(或载物台下降), 然后把标本片移到载物台前方, 再取下。

4. 油镜的使用方法

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像, 把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开, 在标本片上滴一滴香柏油, 眼睛从侧面注视镜头, 轻轻转换油镜, 使镜面浸在油滴中。在一般情况下, 转过油镜即可看到物像, 如不清楚, 可来回调动细调节器, 即可看清物像。如仍看不清, 应按上述步骤重复操作。

(3) 找到物像后, 再调节聚光器和光圈, 选择最适光线。

(4) 油镜使用完毕后, 把镜头上升约 10mm, 并转到一边, 用擦镜纸把镜头擦净。如擦不干净, 可用擦镜纸蘸少许镜头清洗剂或二甲苯轻擦, 然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖玻片的标本片, 可用擦镜纸蘸少许镜头清洗剂或二甲苯, 把油擦净。无盖玻

片的标本片,可用拉纸法擦油。方法:先把一小张擦镜纸盖在油滴上,再滴上二甲苯,平拉擦镜纸,反复几次即可擦净;也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

5. 使用练习

(1) 低倍镜使用练习:取一张 A 字片,用低倍镜观察。练习对光、调焦,并注意观察物像与玻片移动方向是否一致,镜下观察的字母是正像还是倒像?

(2) 高倍镜使用练习:取一张毛发交叉片,先用低倍镜观察,找到羊毛交叉点,移到视野中央,换高倍镜观察。调节焦距,注意观察上下羊毛的清晰度。

(3) 油镜使用练习:取一张血涂片,先用低倍镜、高倍镜观察,再练习用油镜观察。注意比较三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同。练习分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和标本片。

(四) 使用显微镜的注意事项

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂,左手托镜座,切勿一手斜提,前后摆动,以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时,显微镜离实验台边缘应保持一定距离(约 10cm),以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过 45°,用完立即还原。

(3) 使用时要严格按步骤操作,熟悉显微镜各部件性能,掌握粗、细调节器的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节器向下时,眼睛必须注视物镜镜头。

(4) 观察带有液体的临时标本时要加盖片,不能使用倾斜载物台,以免液体污染镜头和显微镜。

(5) 粗、细调节器要配合使用,细调节器不能单方向过度旋转,调节焦距时,要从侧面注视镜筒下降,以免压坏标本和镜头。

(6) 用单筒显微镜观察标本,应双眼同时睁开,左眼观察物像,右眼用以绘图,左手调节焦距,右手移动标本或绘图。

(7) 禁止随意拧开或调换目镜、物镜和聚光器等零件。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙东西擦拭,以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂和药品,如碘、乙醇溶液、酸类、碱类等都不能与显微镜接触,如不慎污染时,应立即擦干净。

(10) 实验完毕,要将玻片取出,用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开,不能与通光孔相对。用绸布包好,放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下曝晒。

五、作业与思考题

1. 作业

(1) 填图(图 1-3)。

(2) 简述显微镜的规范使用步骤。

2. 思考题

(1) 为什么使用高倍镜和油镜时,必须从低倍镜开始?

(2) 显微镜下看到的物像是正像还是倒像?物像与玻片的移动方向是否一致?为什么?



图 1-3 YS-100 双目显微镜

(3) 如果在高倍镜下未找到你所需要观察的物像, 你应该从哪些方面找原因, 以求解决。

实验 2 相差显微镜的原理与使用

一、实验目的

- (1) 了解相差显微镜的构造及工作原理。
- (2) 掌握相差显微镜的正确使用方法。

二、实验原理

光波有波长、频率、振幅、相位 4 种基本属性。其中, 可见光波波长 (频率) 的变化表现为颜色的不同; 振幅变化则表现为亮度 (明暗) 的不同; 相位变化则表现为某一时间上光的波动所能达到的位置的不同 (即相差)。当光波通过两种折射率不同的物质时, 其波长、振幅和相位皆有不同的变化。例如, 光波分别通过 1cm 厚的水和 1cm 厚的玻璃时, 由于玻璃的密度和折射率比水大, 所以通过玻璃的光波波长和频率都小于水, 并且通过两者的光波在相位上也存在一定的差异。相差决定于光波所通过介质的折射率之差及其厚度, 介质越厚或折射率越大, 光波减速也越大。在人的视觉系统中, 光波的波长 (频率) 和振幅 (亮度) 的改变能够被人的眼睛所辨别, 但相位的变化则是人的肉眼所察觉不到的。

当在普通显微镜下观察染色的标本时, 由于借助了固定和染色等理化方法对标本进行了处理, 使光通过样本时发生了光波波长和振幅的改变, 因此, 被检标本才能被观察到。而对于活细胞和未经染色的生物标本, 细胞各种微细结构的折射率和厚度只略有不同; 光波通过这类标本时, 透过光波的波长和振幅并不发生较大改变, 仅相位发生了人眼无法加以鉴别的

微小变化；因此这类标本在普通显微镜下难以观察到，需要改用相差显微镜来进行观察。

相差显微镜是荷兰科学家 Zernike 于 1935 年发明的，能将物体本身的相位差转换成振幅差的一类显微镜，它可用来观察未染色的标本。当光波透过活细胞或未经染色的生物标本时，一部分仍为光波属性未发生改变的直射光（S），另一部分则由于光的衍射现象而向周围发散成为衍射光（D）。衍射光较直射光来说，波长一致但振幅小，且相位滞后大约 1/4 波长；同时到达一点时，两者形成合成波（P），相互干涉。因此，如果把直射光的

相位推迟 1/4 波长，它就能与衍射光保持相同的相位，合成波（P）的振幅则等于直射光与衍射光的振幅叠加（ $P=S+D$ ），实现振幅加大，所观察标本亮度提高的效果。相差显微镜即能够改变直射光或衍射光的相位，并且利用光的衍射和干涉现象，把相差变成振幅差（明暗差），同时它还吸收部分直射光线，以增大其明暗的反差。

相差显微镜的基本成像原理是：照明光束从环状光阑的环状孔射入聚光器，照射到载物台上的被检标本；入射光经标本后，除透过的直射光之外，同时产生相位滞后的衍射光。直射光和衍射光通过相差物镜，前者由共轭面，后者由补偿面透过相板，相互干涉成像。被检标本的影像由直射光和衍射光经干涉后的合成波形成，背景仅由直射光形成。成像光束最后由物镜进入目镜，被再次放大。相差显微镜的光路如图 2-1 所示。

相差显微镜主要用于观察活体细胞、不染色的组织切片或减少反差的染色标本，但切片都不宜过厚，一般以不超过 $20\mu\text{m}$ 为宜，载玻片须均匀一致，厚度

在 1mm 左右，盖玻片也以 0.17~0.18mm 的厚度为宜。

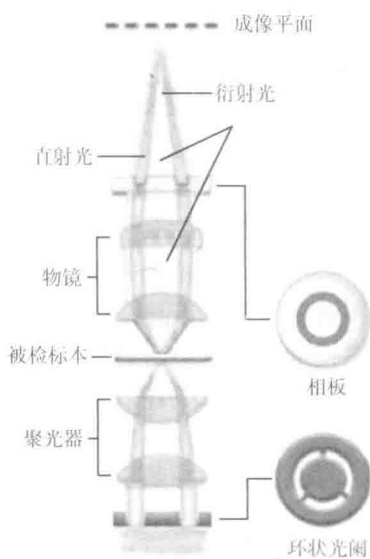


图 2-1 相差显微镜的光路图（仿制
www.microscopyu.com）

三、实验仪器、材料和试剂

1. 器材 普通光学显微镜、相差显微镜配件（相差物镜、转盘聚光器、合轴调中望远镜、绿色滤光片）、擦镜纸、载玻片、盖玻片、滤纸、刀片、镊子、吸管等。
2. 试剂 0.9%生理盐水。
3. 材料 洋葱鳞茎。

四、方法与步骤

（一）相差显微镜的构造

相差显微镜的基本结构与普通光学显微镜的基本结构相同；但其将相位差变为振幅差的工作则是由聚光器下的环状光阑和相差显微镜物镜镜头中的特殊装置——相板来完成的，它们可以将直接通过物体的直接光和衍射光区分开来，并进行干涉成像。除环状光阑和相