

高等医学院校改革创新整合教材

供高职高专护理、助产、医学检验技术、口腔医学技术等专业使用

细胞分子生物学与遗传学实验

主 编 杨保胜

高等医学院校改革创新整合教材

细胞分子生物学与遗传学实验

供高职高专护理、助产、医学检验技术、口腔医学技术等专业使用

主 编 杨保胜

副主编 石如玲 王文锋

编 委 (按姓氏拼音排序)

石如玲 (新乡医学院)

石晓卫 (新乡医学院三全学院)

王文锋 (新乡医学院)

杨保胜 (新乡医学院三全学院)

杨全中 (新乡医学院三全学院)

咎玉玺 (新乡医学院)

张 靖 (新乡医学院三全学院)

张 婷 (新乡医学院三全学院)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞分子生物学与遗传学实验/杨保胜主编.—北京:
人民卫生出版社,2015

ISBN 978-7-117-20980-9

I. ①细… II. ①杨… III. ①人体细胞学-分子生物学-实验-高等职业教育-教材②遗传学-实验-高等职业教育-教材 IV. ①R329.2-33②Q3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 136786 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询,在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导,医学数据库服务,医学教育资源,大众健康资讯

版权所有,侵权必究!

细胞分子生物学与遗传学实验

主 编:杨保胜

出版发行:人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址:北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编:100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线:010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷:保定市中华美凯印刷有限公司

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:6 插页:1

字 数:146 千字

版 次:2015 年 8 月第 1 版 2015 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 978-7-117-20980-9/R·20981

定 价:19.00 元

打击盗版举报电话:010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

高等医学院校改革创新整合教材

编审委员会

主任委员:杨捷

常务副主任委员:王洪兴 杨保胜

副主任委员:袁磊 杜华贞 李勇莉

委员:丰慧根 闫福林 李东亮 王俐

刘恒兴 李银生 何群力 李万里

陈正跃

秘书:李勇莉(兼)

高等医学院校改革创新整合教材

总主编 杨保胜 杨 捷

细胞分子生物学与遗传学	主编:杨保胜
人体解剖学与组织胚胎学	主编:刘恒兴 李银生
疾病的病原与病理基础	主编:何群力 李万里
医学机能学	主编:李东亮
细胞分子生物学与遗传学实验	主编:杨保胜
人体解剖学与组织胚胎学实验	主编:李银生 刘恒兴
疾病的病原与病理基础实验	主编:何群力 李万里
医学机能学实验	主编:李东亮

序

随着我国高职教育模式转型和建设应用型技术大学的要求,高校面临许多挑战,如高职非临床医学专业的基础医学课程仍沿用传统的“本科压缩饼干”模式,在课程设置、教学内容、教学模式与培养目标和培养要求等诸多方面皆存在明显的脱节。使用传统的“以学科课程为单位”的教材,由于内容过深、课时紧张,教师难以把握教学内容,教师难教;学生难以把握学习要点,学生难学。学生一方面难以学懂学会,另一方面所学的许多内容与专业学习及未来工作的联系不大,直接影响到学生专业知识和技能的学习。

针对上述情况,新乡医学院三全学院立项并开展了高职非临床医学专业课程体系改革的研究,我们根据培养目标,依据医学科学本身的内在联系,打破“大而全”,体现“少而精”,以学科整合为基础,精选基础理论与基本知识,强化技能培养,重构基础医学与实践相结合的知识、能力、素质协调发展的新型整合课程体系。作为这一教学改革课题的物化成果,诞生了本系列改革创新整合教材。

在课程整合和教学内容上,根据国家教育部规定的“基础理论教学以应用为目的,以必需、够用为度,以讲清概念、强化应用为教学重点”的原则,不仅仅是将基础医学课程进行简单的压缩和删减,而是以“结构-功能-疾病为主线”,着重于基础医学的本质、特征和发展规律,打破学科间的界限,将基础医学知识纵横、有机地结合起来,删除陈旧的、重复的和过深的内容,重组优化课程体系,以期减轻学生学业负担。在强调“必需、够用”同时,适当增补新知识、新概念、新理论和新信息。

为强化学生的创新能力、获取信息能力、综合运用知识的能力和终身学习能力的培养,我们同时进行数字化课程建设,编写纸质与数字化资源相结合的系列整合教材,建设相应课程网站,探索以数字化教学为主导的线上和线下混合式教学,通过线上交互,在线提交作业,在线阶段性、形成性评价等,将传统的教学模式与线上教学结合起来,培养学生主动获取知识、信息及处理信息的能力。制作了一批具有自主知识产权的数字化资源,包括动画、教学视频、微课、案例讨论、临床聚焦、研究进展、深入学习、在线自测、在线作业、教学 PPT、图片等,并在纸质教材的相应位置标出数字化资源的类型和名称。

本系列改革创新整合课程融合原 12 门学科知识为 4 门整合课程,即整合细胞生物学、生物化学、分子生物学和医学遗传学 4 门课程为《细胞分子生物学与遗传学》;整合解剖学、组织学和胚胎学 3 门课程为《人体解剖学与组织胚胎学》,整合微生物学、寄生虫学、免疫学、病理学 4 门课程为《疾病的病原与病理学基础》,整合生理学、药理学、病理生理学 3 门课程为《医学机能学》。本套教材包括 4 本理论教材和配套的 4 本实验教材。

编写整合课程的数字化教材是一项新的尝试,其内容和形式尚需深入探索和推敲。但这套教材能否实现我们的初衷,能否适应相应人才培养的需要,还有待教学实践的检验,我们期待着同行和读者的赐教指正。

本套教材在学校领导和教务部的大力支持下,由基础医学院、生命科学技术学院和药学院的老师们精诚协作,共同努力完成。人民卫生出版社和各位主编给予了支持和帮助。我谨此代表本系列改革创新整合教材编审委员会向有关各方表示最诚挚的谢意。

主任委员 杨捷

2015年5月于新乡

前言

为积极践行和创新先进职业教育理念,加强实践教学在人才培养和教学工作中的地位,逐步形成理论教学与实践教学统筹协调的理念和氛围,尝试建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系;我们组织相关学科的一线教师,合作编写了《细胞分子生物学与遗传学实验》教材。本实验教材将传统的医学细胞生物学、生物化学、分子生物学和医学遗传学四门课程的内容进行了合理取舍、有机整合。在教学安排上,增加了实验教学学时(理论与实践的学时比例为1:1.5),以期强化培养学生的基本实验操作能力、观察和分析问题的能力、科学思维能力、创新精神和基本的医学科研能力。

按照“简明精炼、注重实践、特色鲜明、新颖实用,质量一流”的总体要求,本实验教材力图体现更新教育思想、转变教育观念,密切联系医学实际,以满足实验教学课程体系改革的目标。细胞分子生物学与遗传学实验是医学专科学科生的一门必修的重要基础实验课,为学习后续课程和解决实际问题提供了必不可少的医学基本操作技能和方法。

本实验教材的编写得到了新乡医学院三全学院领导和教务部门的关注和支持,采纳了不少读者的宝贵意见,引用和借鉴了国内外许多实验教材的资料,在此一并表示衷心感谢。编写整合性实验教材是一项新的尝试,可供借鉴的资料不多,鉴于编者理念及学识有限,编写的时间也较匆促,虽经编者和专家的多次审阅和核对,疏漏与错误在所难免,衷心期待同行专家和使用本教材的老师和同学们给予坦诚的批评和指正,以便再次印刷时修订和完善。

杨保胜

2015年5月

目 录

第一篇 医学细胞生物学实验

实验一	显微镜技术	1
实验二	细胞形态观察	9
实验三	小鼠腹腔巨噬细胞吞噬实验	13
实验四	小鼠骨髓细胞染色体标本的制备及观察	15
实验五	细胞有丝分裂标本的制备与观察	17
实验六	细胞减数分裂标本的制备与观察	20

第二篇 生物化学与分子生物学实验

实验七	生物化学实验基本操作	23
实验八	双缩脲法测定蛋白质含量	29
实验九	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	31
实验十	pH、温度对酶促反应速度的影响	35
实验十一	血清丙氨酸氨基转移酶测定	39
实验十二	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	42
实验十三	胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	45
实验十四	氨基酸薄层层析	47
实验十五	质粒 DNA 的提取、纯化及限制性酶切实验	50
实验十六	DNA 的重组连接、感受态细胞的制备及质粒转化	54

第三篇 医学遗传学实验

实验十七	人类染色体标本制备与核型分析	59
实验十八	人类某些遗传性状的调查分析与皮纹分析	70
实验十九	系谱分析与遗传咨询	76
参考文献		88
附录一:	人类 G 显带染色体核型图(供剪贴用)	
附录二:	人类 G 显带染色体核型分析报告单	

第一篇 医学细胞生物学实验

实验一 显微镜技术

显微技术 (microscopy) 是利用光学系统或电子光学系统设备, 观察肉眼所不能分辨的微小物体形态结构及其特性的技术。**光学显微镜** (light microscope) 简称显微镜或光镜, 是光学显微镜技术的主要工具, 是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。原始的光学显微镜是一个高倍率的放大镜。1610 年意大利物理学家伽利略已制作过复式显微镜观察昆虫的复眼。这是一种已具有目镜、物镜和镜筒等装置, 并固定在支架上的显微镜。荷兰人列文虎克一生制作了不少于 247 架显微镜, 观察了许多细菌、原生动物和动、植物组织, 是第一个用显微镜进行科学观察的人。

随着科学技术与光学理论的发展, 显微镜的种类越来越多 (如解剖显微镜、倒置显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜等), 性能更加完善, 使用范围也越来越广泛。1931 年, 恩斯特·鲁斯卡通过研制电子显微镜, 使细胞生物学发生了一场革命, 这使得科学家能观察到像百万分之一毫米那样小的物体。现代的显微镜不仅可以用来观察细胞的形态和内部结构, 而且还可以通过与其他技术的结合, 进行细胞组分的定性、定位、定量分析及物质代谢、细胞生理、细胞通信、细胞免疫和遗传学等功能的研究。

一、实验目的

1. 通过学习光学显微镜技术, 熟悉普通光学显微镜各个部分的结构和功能。
2. 重点掌握低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。
3. 掌握光学显微镜使用的注意事项及显微镜放大倍数的计算方法。

二、实验原理

1. 显微镜成像原理 光镜是如何使微小物体放大的呢? 物镜和目镜的结构虽然比较复杂, 但物镜和目镜的作用都相当于一个凸透镜。首先光射到物体上, 再从物体射入物镜和目镜, 最后射入观察者的眼睛, 在此过程中成像并放大。成像过程为被检标本放在物镜下方 1~2 倍焦距之间, 所以物镜可以使标本在物镜上方形成倒立放大的实像; 该实像正好在目镜下焦点以内, 通过目镜又形成倒立放大的虚像; 通过调焦可使该像在眼睛的明视距离内, 通过眼球晶状体最后在视网膜上成为正立的像。在成像过程中物镜与目镜都具有凸透镜的作用, 人眼球的晶状体也有透镜功能。

2. 显微镜的性能 显微镜的性能高低可以由各个指标来反映, 其中包括放大率、镜口

率、分辨率等。在显微镜的性能指标中最重要的是分辨率,其他如放大率、焦点深度、视野范围和镜像亮度也各有其重要意义。这些性能彼此相互作用又相互制约,必须注意影响显微镜性能的各种因素,以发挥显微镜的最大性能。

(1) **镜口率**(numeric aperture, NA):镜口率又称数值孔径,简称为 NA,刻在物镜筒外侧和聚光镜上。聚光镜的数值孔径一般为 1.2、1.25、1.3 和 1.4。干燥系物镜的数值孔径一般为 0.05~0.95,水浸系物镜为 1.0~1.25,油浸系物镜为 0.85~1.40。

数值孔径是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数。NA 与分辨率成正比,NA 越大,显微镜的分辨率越高。若想使数值孔径值大,可将物镜前透镜与样品之间的间距适当缩短即得到适宜的工作距离以保证足够大的镜口率。此外还需选配镜口率相同的聚光镜。

(2) **分辨率**(resolving power, R):也称分辨本领,是指能区分两个物点间最小距离的能力。两物点间的最小距离称为分辨距离。分辨距离越小,则分辨率越高。以此来表示分辨的程度也就是分辨微细结构的能力。数值孔径越大,所用光波波长越短就越能提高分辨率。

(3) **放大率**(magnification, M):最终成像的大小与原物体大小的比值称为放大率。

$$\text{总放大率} = \text{物镜放大率} \times \text{目镜放大率}$$

选用物镜和目镜时应注意两者的配合,如选用 NA 值大的物镜和倍数小的目镜,虽最终放大率相等但可以保证高分辨率。

(4) **焦点深度**(focal depth):将焦点调在样品上的某一平面时,能看清楚这一平面及其上下的结构,此清晰部分的厚度称焦点深度。以 T 表示。T 值大,焦点深,可保证观察到被检物体的全层,但 T 与 M(总放大倍数)和 NA 成反比,如拟得高值的 M 和 NA, T 自然变为小值。

(5) **镜像亮度**(light of image, L):镜像亮度与数值孔径的平方成正比,与总放大率的平方成反比。在同一放大率下选用不同数值孔径的物镜,其镜像亮度也不同。

(6) **视野亮度**:如拟得到足够的视野亮度,必须用强光源、开大光阑、使聚光镜与物镜两者的镜口角一致,才能使充足的光束进入物镜。可见视野亮度与光源、反射镜、光阑、聚光镜、物镜和目镜均有直接关系。

三、实验器材和试剂

1. **器材** 普通光学显微镜、倒置相差显微镜、荧光显微镜、暗视野显微镜、电视显微镜、细胞培养用品、擦镜纸、吸水纸、载玻片、盖玻片。

2. **试剂** 乙醚酒精、二甲苯(xylenol)、香柏油。

3. **材料** 英语字母装片、口腔上皮细胞涂片、蛙血涂片、人血涂片、培养细胞涂片。

四、实验内容与方法

(一) 普通光学显微镜的结构和使用

显微镜是一种比较复杂的光学仪器,它的作用是将细微的结构适当放大,以便于观察。

它是生物学和医学教学、科研和临床工作中常用的必备工具之一。因此,可以把显微镜形象地比喻为医生的“眼睛”。

1. 显微镜的构造 根据构造和使用目的不同分为单式显微镜(magnifier)和复式显微镜(compound microscope)。前者由一块或几块透镜组成,放大倍数不高,如放大镜和平台解剖镜等;后者构造复杂,由目镜、物镜和聚光器组成,放大倍数较高,如双筒显微镜等。

比较高级的显微镜上都设有倾斜式的双目镜筒,称为双筒显微镜(binocular microscope)。在物镜转换器上方装有四个棱镜,使经过物镜的光线平分为两路达到目镜,故双筒显微镜的视野亮度要比单筒者暗。双筒显微镜的优点是可同时用两眼观察,以防止疲劳并增加立体感。此外,相差、暗视野、偏光、荧光等各种显微镜都是在此基础上制成的。

显微镜在结构上分为光学、照明和机械三部分。光学部分是显微镜的主要部件,决定着光学性能,但仍需后两者的精密配合,才能有效地发挥作用(图 1-1)。

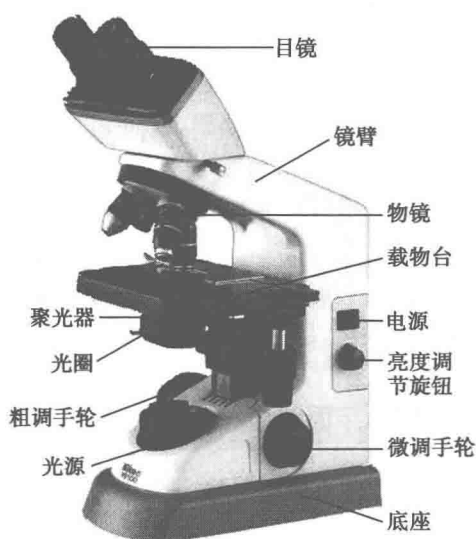


图 1-1 显微镜的结构

(1) 光学系统:光学系统(optical system)

由物镜(objective)、目镜(ocular eyepiece)组成。

1) 物镜:由凸凹透镜组成,装在物镜转换器上,在物镜的外表面标注放大倍数和数值孔径以及镜筒长度和盖玻片的厚度等。如“40”表示放大倍数,“0.70”为数值孔径,“160”为镜筒长,“0.17”是所要求的盖玻片厚度,三者单位均为毫米。标有 apo(或 apochromatic)者为复消色差物镜,标有 aplan(或 aplanchromatic)者为常消色差物镜。物镜的功能有二:一为产生生物体的第一次倒立实像,二为放大作用。

物镜的分类有三种方法:①物镜按放大倍数不同可分 4 类:放大倍数通常以“×”代表倍数。低倍物镜的放大倍数为 1~5 倍,中倍物镜放大倍数为 5~65 倍,高倍物镜放大倍数为 65~95 倍,油浸高倍物镜放大倍数为 90~100

倍,低倍物镜较短,镜孔直径最大,高倍物镜较长,镜孔直径较小,油镜最长,镜孔直径最小。②按物镜与标本之间的介质不同分 3 类:一是干燥系(dry system)物镜:指观察标本时在物镜与标本之间以空气作为介质,其折射率为 1;二是油浸系(oil immersion system)物镜:标本与物镜之间以香柏油为介质,其折射率为 1.515;三是水浸系(water immersion system)物镜:标本与物镜之间以水为介质,折射率为 1.333。③物镜按所校正的误差不同可分为 3 类:一是消色差物镜(achromatic objective):用钙、硅酸钾制作凸透镜,用铝、硅酸钾制作凹透镜,两者黏合起来则组成消色差物镜。能消除球差和色差两种误差。二是复消色差物镜(apochromatic objective):用石英玻璃和氮化钙结晶制成凸凹透镜,能使红、绿、蓝多种光会聚在同一点,而消除了多种色差和球差。三是平场物镜(plan objective):在消色差物镜和复消色差物镜中加有一块厚的弯月形透镜而组成平场物镜,可用以校正和消除像面弯曲而使像平坦。

2) 目镜:光学系统的另一部分是目镜,目镜由平凸透镜组成。目镜的外表面上标有

放大倍数,如“5”、“6.3”或“10”等。目镜的功能有二:一是将物镜形成的倒立实像变成正立的虚像,二是将像再放大4~16倍。目镜中可安装一指针,用以指明视野中的观察部位。

(2) 照明系统:照明系统功能有二:一为改变入射光的性质,即决定吸收哪些光和透过哪些光;二为改变入射光的强度,即调节光束大小。照明系统包括光源、聚光镜、光阑和反射镜。

1) 光源:显微镜的照明光源分为天然光源和人工光源。天然光源以通过白云的太阳光最为柔和,对人眼无伤害。天然光源的视野亮度与放大倍数成反比,放大倍数越高时视野越暗,故观察细致的结构、要求放大倍数较高时,多采用人工光源。人工光源一般都采用低压灯泡所产生的强光,再通过会聚透镜加强光的亮度并使光均匀照射。

2) 聚光镜(condenser):聚光镜位于镜台之下,由1~3块透镜组成。为了充分发挥物镜的性能,必须使聚光镜的数值孔径与物镜一致。可通过聚光镜螺旋升降聚光镜,上升时光线增强,下降时光线减弱。

3) 光阑(diaphragm):装在聚光镜下的光阑能够控制光束的大小而起调节亮度的作用。光阑有2类:一是虹彩光阑,由多个半月形的薄金属片重叠镶在圆形框架上,各片之间是活动的,可由把手调控。光阑的中心为透光孔,孔的大小可根据需要进行调节;二是转盘光阑,也称环状光阑,为一块设有大小不等环形孔洞的平板,选择不同的孔洞便可控制光量、提供不同亮度。每种环孔与相应的物镜对应使用。

4) 反射镜(reflection mirror):反射镜在光阑的下面,是一面为平面、另一面为凹面的双面反射镜,可向各方向转动和翻转来改变采光的方向。平面镜反射的光较弱,而凹面镜反射的光强度较大、亮度较高。

(3) 机械系统:机械系统(mechanical system)是精密而牢固的部件,用以与光学系统和照明系统配合,使显微镜成为一个整体来完成光学仪器的作用。

1) 镜座(base or foot):镜座是起支持作用的基座,在显微镜的镜座内装有照明光源、反射镜和光阑。

2) 镜臂(arm):镜臂上有倾斜关节可以调节观察时的角度,对镜筒起支持作用,还装有载物台、调焦装置等。

3) 载物台(stage):载物台用以放置玻片标本,台中有通光孔,台上有标本移动器,可以固定和移动标本。

4) 镜筒(tube):镜筒附着于镜臂上,上端承纳目镜,下端与物镜转换器连接,可以容纳多个物镜;双筒显微镜一般为斜式的,两个镜筒之间的距离是可调的,以适合人的瞳距。

5) 物镜转换器(revolving nose-piece):物镜转换器在镜筒的下端,便于更换物镜,可容纳不同倍数不同种类的物镜。

6) 调焦装置(focusing adjustment):用以调节物镜和被检样品之间的距离(称为调节焦点);调焦装置包括粗调和细调螺旋,为了使样品中微细结构看得清晰,需先进行粗调后再进行微细调节。

2. 显微镜的使用

(1) 低倍镜的使用方法:显微镜使用之前应先取出放好,右手握镜臂,左手托镜座,从镜盒中取出显微镜,轻放在左前方的实验台上,离实验台3~6cm为宜,以便观察。

1) 对光:转动粗调螺旋,使物镜与载物台距离略拉开。转动物镜转换器使低倍镜对准通光孔,当听到一声轻微扣紧声时,表示目镜与物镜的光轴一致,打开光圈(从反光镜中可窥视),上升聚光镜。双目齐睁,向目镜内观察(单目显微镜用左眼观察),转动反光镜(一般用凹面镜),约以光源与透光孔成 45° 角,将聚光镜内反射光线射入视野内,以观察到镜内明亮均匀为止。

2) 放片:先移开物镜,将玻片标本(注意有盖玻片的片面朝上)放在载物台上,用标本夹固定标本,旋转标本移动器螺旋,使玻片标本上被观察的目标对准通光孔的正中央。

3) 调节焦距:先将粗调螺旋调至标本与低倍镜相距 0.5cm 处(有的显微镜可以调至最短距离后,不再移动),再慢慢转动粗调螺旋使镜筒上升(或载物台下降),将距离拉开,这样直到看到物像清晰为止。如第一次因误没有成功,必须从头开始。

4) 低倍镜使用练习:在对好光的基础上,取一张A字母装片,放在载物台上,用标本夹固定标本,旋转标本移动器螺旋,使装片上的A字母对准通光孔的正中央。调焦,在低倍镜下找到目的物,使用标本移动器将要观察的部分移至视野中央。并注意观察物像与玻片移动方向是否一致,镜下观察的物像(A字母)是正像还是反像。

(2) 高倍镜的使用方法

1) 先在低倍镜下找到目的物,将要放大的部分移至视野中央。

2) 从侧面观察物镜,转动转换器,使高倍镜对准通光孔。

3) 从目镜观察,一般配套较好的显微镜,即可看到模糊的目的物,此时工作距离(物镜与标本之间距离)有可能已超过(过近)或不够(过远),只需轻轻转动细调螺旋,即可得到清晰的图像。

4) 高倍镜使用练习:取一张口腔上皮细胞涂片或人(蛙)血涂片,先在低倍镜下找到细胞,移到视野中央,直接换高倍镜。调节焦距,注意观察细胞不同组分的清晰度。

如在低倍镜下看到物像,换高倍镜后找不到图像,可能有以下几种原因:①被观察的目的物不在视野中央,需从低倍镜移至中央再转换高倍镜;②标本色浅,光太强,应缩小光圈(或降低聚光镜),减弱光源射入;③标本放反了,使观察标本与物镜间相距增加了一个载玻片距离,应将玻片翻转后,重新调节观察。

(3) 油镜的使用方法

1) 首先依次在低倍镜和高倍镜下找到物像,将所要观察的部分移至视野中心,光圈开大,聚光镜上升到最高位置。

2) 转动物镜转换器,把高倍镜移开,在标本上滴一滴香柏油,再把油镜转到标本上方。

3) 从目镜观察,同时稍微调节细调螺旋,直到物像清楚为止。

4) 油镜使用练习:按上述操作方法,观察血涂片,先低倍,后高倍找到物像后,将所要观察的部分移至视野中心并调节清楚,再用油镜观察。注意观察三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同,练习在高倍镜和油镜下区分红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和玻片标本。

使用油镜时不要使显微镜(对单目显微镜而言)倾斜,以免香柏油流到其他部位。油镜使用后,将镜筒升高(或载物台下降)约 10mm ,将油镜头转到一边,先用一片擦镜纸将镜头上的油擦去。另用一片浸有乙醚酒精(或二甲苯)的擦镜纸,再次擦净镜头上的油,最后再用

一块洁净的擦镜纸将镜头擦干净。对玻片标本也需如此处理,但标本片上未加盖片时,则不要用擦镜纸直接擦,可用拉纸法擦油。方法是: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。对油滴较小的无盖片标本,观察后把带有油的标本插入切片盒即可。

(4) 使用显微镜注意事项

- 1) 取显微镜时必需右手握镜臂,左手托镜座,切勿单手斜提,以防碰撞和零件脱落。
- 2) 显微镜放在自己前面稍偏左侧,坐着进行操作,如使用的是单目显微镜时,不能过于倾斜(不要超过 45° 角,双目显微镜没有此要求),以防倾倒落地。
- 3) 擦拭显微镜的光学部分,必须用擦镜纸,切忌用其他硬纸或手帕等擦拭,以免损伤镜头。
- 4) 含水较多的临时标本,不要倾斜观察,切忌水、酒精或其他药品浸损镜台或镜头。
- 5) 不要任意取下目镜和物镜以防灰尘落入,也勿任意拆卸零件,防止意外损坏。
- 6) 当用眼观察标本时,不能用粗调螺旋降镜筒(或升高载物台),以免标本与镜头发生碰撞,损坏物镜和标本。
- 7) 观察时应两眼同时睁开,用左手调节粗细螺旋,用右手调节标本移动器(或直接移动标本)。
- 8) 使用显微镜后,将显微镜擦拭干净。转动粗调节器使镜筒上升(或载物台下降),取下标本并转动物镜转换器,使物镜在载物台上叉开形成“八”字形,不要使物镜直接对着通光孔,以免镜筒下滑,碰坏镜头。同时适当下降聚光镜,关闭光圈,将反光镜侧立,按操作规程将显微镜送入箱内。

(二) 其他几种常用显微镜简介

随着生命科学技术与光学显微镜技术的结合,近几十年来,人们进一步研制出了具有多种特殊功能的光学显微镜,使光学显微镜的应用领域从单一的形态学研究扩展到动态研究细胞的结构与功能关系的新的领域。作为 21 世纪的医学及相关学科的学生,熟悉和掌握常用的特殊光学显微镜的技术是非常必要的。下面重点介绍几种常用的特殊显微镜。

1. 相差显微镜 相差显微镜(phase contrast microscope)的优点是能观察无色、透明、活细胞中的微细结构。这种显微镜是利用光的衍射和干涉特性使相位差变成振幅差,表现为明与暗的对比,使人眼得以观察到无色透明物体中的细节。普通显微镜下,光波通过样品后,颜色和亮度均不改变时,观察不出结构。需将样品染色,使不同波长的光通过样品后形成各种颜色,不同振幅的光通过样品形成不同亮度,借颜色和亮度上的差别而得以辨认。相差显微镜可用于观察和研究培养的活细胞,如细胞的生长、运动、分裂、分化、衰老和死亡过程中细胞形态及其内部结构的连续变化。常用明反差观察活细胞的微细结构、活细胞的运动以及进行细胞内某些结构的定量。用暗反差来加强半透明样品的反差,使样品的结构更加清晰。倒置相差显微镜与缩时连续摄影或摄像结合起来,可真实记录下细胞的渐变过程,比用一般的定时染色、切片观察记录后,再拼接起来的方法要完整、准确和真实得多。

2. 暗视野显微镜 暗视野显微镜(dark field microscope)是根据光学中的丁道尔(Tyndall)现象原理设计的显微镜,可用来研究活细胞的形态和运动。以暗视野照明法观察

物体的结构。光线经样品反射(散射)和衍射再进入物镜,光源的光不直接进入物镜。所以样品是亮的、背景为暗的。

暗视野显微镜最适于观察微粒,可看到直径小于 $0.1\mu\text{m}$ (普通显微镜仅能分辨 $0.2\mu\text{m}$) 的微粒,可显示 4nm 以上的微小颗粒的存在和运动。这是暗视野显微镜的独特之处。暗视野显微镜还可用于观察活物体的存在以及活物体的运动状态,如海胆精子的鞭毛滑动而变长的情况,但不能分辨其内部的微细结构。

3. 偏光显微镜 偏光显微镜(polarizing microscope)上配有尼科尔棱镜,能将普通光改变成偏振光。用偏振光检查物质的双折射性是偏光显微镜的特有功能。对偏光显微镜下所观察的样品有一定要求,切片不能过薄、样品不能无规则,否则不能显示双折射性。以活细胞样品为宜,避免因处理样品过程中样品发生变性而失去双折射性。尽量避免人工因素造成对样品性质的“歪曲”。

在生物学和细胞生物学研究中使用偏光显微镜主要观察有序性的生活物体样品,如与晶体类似的有规则性的纤维物质,如纤维丝、染色体、纺锤丝、毛发、胶原、神经纤维、横纹肌和骨磨片等样品中微细结构的研究。也可以观察有序性的固定的死后标本。

4. 荧光显微镜 荧光显微镜(fluorescence microscope)是以紫外线为光源,使样品被照射而激发出可见的荧光。根据荧光的有无或强弱来观察样品的性质和成分。荧光显微镜就是根据这一现象而设计的显微放大装置,可以观察到这些荧光物质在细胞内的分布位置。近年来发展起来的免疫荧光显微镜技术(immunofluorescence microscopy),将免疫学方法与荧光染色方法相结合,以检测细胞的抗原或抗体成分。

荧光显微镜技术主要用于检测与荧光染料共价结合的特殊蛋白质或其他分子。由于荧光显微镜技术具有染色简便、标本色彩鲜艳,敏感性高(用极低浓度,如 ppm 级荧光染料就可清楚地显示细胞内特定成分),特异性强的特点,在生物医学领域已被广泛应用。

5. 实体(解剖)显微镜 实体(解剖)显微镜(stereomicroscope)为工作距离较长,直立成像,放大倍数不高的便于解剖操作的显微镜。最高可放大 200 倍,一般为 30 ~ 100 倍。其双目镜筒的两光路与标本间并不平行,而有一体视角(stereoangle),使观察标本有立体感。该角为 $12^\circ \sim 15^\circ$ 。其视野大,焦点深度也较大,便于解剖操作。照明方式有两种:一种标本操作台面对玻璃,台下为灯室,此为透射照明,用于观察和解剖薄而透光的标本。另一为从标本台的侧上方,斜落照射于标本上,且可围绕物镜改变斜照射位置,便于较厚标本或小动物或器官的解剖。

6. 激光扫描共聚焦显微镜 激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope)是 20 世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品,它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,把光学成像的分辨率提高了 30% ~ 40%,使用紫外或可见光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像。

激光扫描共聚焦显微镜目前主要应用的研究范围包括细胞形态学分析(观察细胞或组织内部微细结构,如:细胞内线粒体、内质网、高尔基体、微管、微丝、细胞桥、染色体等亚细胞结构的形态特征;半定量免疫荧光分析)、荧光原位杂交研究、基因定位研究及三维重建分析等。

【思考题】

1. 简述光学显微镜的结构。
2. 简述使用低倍镜、高倍镜和油镜的主要步骤。
3. 为什么使用高倍镜或油镜观察时应从低倍镜开始？在一般情况下使用高倍镜时要用细调螺旋，为什么？
4. 使用显微镜时，如何调节视野内的光线强度？是否光线越强越好？为什么？

(张 靖)