

G2-33

C14

# 细胞生物学与医学遗传学实验指南

主 编 蔡绍京

副主编 梁玉华 金 洁 朱 斌 姜海燕

编 者 (以姓氏笔画为序)

朱 斌 吴守伟 金 洁 姜海燕

梁玉华 蔡绍京

第二军医大学出版社

## 内 容 简 介

本书由徐州医学院、蚌埠医学院、江苏大学、苏州大学四所院校具有丰富教学经验的细胞生物学、医学遗传学教师协作编写。本书的内容既包括经典的细胞生物学实验、医学遗传学实验,也包括反映现代生物学领域研究进展的分子生物学实验,附录部分还编入了动物解剖基础知识、细胞培养技术等内容。本书适用于高等医学院校本、专科细胞生物学、医学遗传学及医学生物学课程的实验教学,也可供医学院校相关专业的研究生使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学与医学遗传学实验指南/蔡绍京主编. —上海:第二军医大学出版社,2002.8  
ISBN 7-81060-262-4

I. 细... II. ①蔡... III. ①细胞生物学-实验-高等学校-教学参考资料②医学遗传学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q2-33②R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 058995 号

### 细胞生物学与医学遗传学实验指南

主 编:蔡绍京

责任编辑:吴 进

第二军医大学出版社出版发行

(上海翔殷路 818 号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

徐州医学院印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:10 字数:256千字

2002年8月第1版 2002年8月第1次印刷

印数:1~7000

ISBN 7-81060-262-4/Q·007;R·201

定价:14.80元

## 前 言

为了促进医学教育的发展,适应教学改革的需要,我们苏皖两省四校的细胞生物学、医学遗传学教师共同编写了本书。

目前各校开设的课程不尽相同,有的院校仍开设医学生物学,主要内容是细胞生物学、医学遗传学,而更多的院校是分别开设细胞生物学和医学遗传学。因此,本书的实验内容既能适应医学生物学实验教学的需要,也能满足细胞生物学和医学遗传学分设的实验教学要求,即具有广泛的适用性。

本书由徐州医学院蔡绍京任主编,蚌埠医学院梁玉华、江苏大学金洁、苏州大学朱斌、姜海燕任副主编。编写之初,首先由主编根据各校的实验开设情况拟定编写大纲,制定编写计划;然后将编写计划分寄每一位作者征求意见,意见统一后进行编写分工,分头编写;各位作者的初稿完成后交主编统一审阅、修改,完成全书的统稿工作;最后,又将全书的初稿寄给各位作者校阅,力图最大限度地减少差错、提高书的质量。

本书由五部分组成。前二部分是细胞生物学实验和医学遗传学实验,这两部分是本书的主要内容,一般院校均有条件开设。需要说明的是,每一节内容的安排是基于内容的相关性,并不代表是一次实验课的内容。比如,细胞的有丝分裂和减数分裂实验,如果是每次实验2课时,应安排两次实验;而有些实验相对简单些,两节的实验内容可安排在一次实验课完成。第三部分是分子生物学实验,供有实验条件的院校选用。第四部分是附录,考虑到掌握动物解剖的基本知识和基本操作是对医学生的基本要求,能为学习人体解剖学知识打下基础,并且有的院校上目前仍开设动物解剖实验,因此,将动物解剖的实验内容列入附录。为了拓宽知识面、扩大学生的视野,附录中还编入了电子显微镜技术、流式细胞术和细胞培养技术等,供学生自学。第五部分是实验报告,有利于学生巩固所学知识,并掌握生物学显微绘图的基本方法与技巧。

在本书的编写过程中,各位作者本着对学生负责的态度,认真、仔细地编写每一节实验内容,付出了辛勤的劳动。尽管如此,由于作者水平所限,仍可能存在不足之处,欢迎使用本书的广大教师及学生提出修改意见,以便再版时修改。

蔡绍京

2002年5月

# 目 录

第一章 细胞生物学实验	(1)
第一节 普通光学显微镜的结构与使用	(3)
第二节 细胞的形态、计数及显微测量	(12)
实验一 临时制片方法及细胞形态的观察	(12)
实验二 细胞计数	(13)
实验三 细胞显微测量	(15)
第三节 细胞的显微结构与超微结构	(17)
实验一 细胞显微结构的观察	(17)
实验二 细胞活体染色和观察	(20)
实验三 细胞超微结构的观察	(20)
第四节 细胞的化学成分与生理活动	(26)
实验一 酸性蛋白和碱性蛋白的显示与观察	(27)
实验二 过氧化氢酶的显示与观察	(27)
实验三 淀粉的显示与观察	(28)
实验四 核酸的显示与观察	(28)
实验五 细胞吞噬活动的观察	(28)
实验六 红细胞膜通透性的观察	(28)
第五节 细胞的有丝分裂与减数分裂	(31)
实验一 植物细胞有丝分裂切片的观察	(31)
实验二 动物细胞有丝分裂切片的观察	(32)
实验三 稻蝗虫精巢切片的观察	(33)
第六节 细胞融合	(38)
第二章 医学遗传学实验	(41)
第一节 小鼠骨髓细胞染色体标本的制备	(43)
第二节 人类染色体标本的制备与非显带核型分析	(46)
实验一 染色体标本的制备	(46)
实验二 染色体核型分析	(47)
第三节 人类染色体 G 显带技术和 G 显带染色体的识别	(51)
实验一 G 显带技术	(51)
实验二 G 显带染色体的识别	(51)
第四节 人类染色体的其他显带技术	(58)
实验一 R 显带	(59)
实验二 C 显带	(60)
实验三 NOR 银染	(60)
实验四 SCD	(61)
第五节 人类性染色质的检测	(63)
实验一 X 染色质的制备与观察	(63)

实验二 Y 染色质的制备与观察 .....	(64)
第六节 人类皮肤纹理分析 .....	(66)
实验一 拓印皮纹 .....	(66)
实验二 皮纹分析 .....	(66)
第七节 人类遗传性状及遗传病系谱分析 .....	(71)
实验一 PTC 尝味能力检测 .....	(72)
实验二 MN 血型系统调查 .....	(72)
实验三 观看人类遗传病录像片 .....	(73)
实验四 人类遗传病系谱分析 .....	(73)
第三章 分子生物学实验 .....	(75)
第一节 人外周血白细胞 DNA 的制备 .....	(77)
第二节 $\lambda$ 噬菌体 DNA 的酶切与电泳 .....	(79)
实验一 $\lambda$ 嗜菌体 DNA Hind III 酶切 .....	(79)
实验二 琼脂糖凝胶电泳分离 $\lambda$ DNA 酶切片段 .....	(80)
第三节 聚合酶链反应 .....	(81)
第四节 基因突变分析(PCR - SSCP) .....	(83)
附 录 .....	(85)
第一节 动物实验的基本知识 .....	(87)
第二节 家兔的解剖 .....	(94)
第三节 电子显微镜技术 .....	(104)
第四节 流式细胞术的原理及应用 .....	(107)
第五节 细胞培养技术 .....	(109)
实验报告 .....	(121)
实验报告一 .....	(123)
实验报告二 .....	(125)
实验报告三 .....	(127)
实验报告四(1) .....	(129)
实验报告四(2) .....	(131)
实验报告五 .....	(133)
实验报告六 .....	(135)
实验报告七 .....	(137)
实验报告八(1) .....	(139)
实验报告八(2) .....	(141)
实验报告九 .....	(143)
实验报告十 .....	(145)
实验报告十一 .....	(147)
实验报告十二 .....	(149)
实验报告十三 .....	(151)
染色体核型照片 .....	(153)

# 第一章 细胞生物学实验



## 第一节 普通光学显微镜的结构与使用

### 【目的与要求】

1. 熟悉普通光学显微镜的主要构造及其性能。
2. 掌握低倍镜及高倍镜的使用方法。
3. 初步掌握油镜的使用方法。
4. 熟悉光学显微镜的维护方法。

### 【器材与试剂】

1. 普通光学显微镜、二甲苯、香柏油、擦镜纸。
2. 血涂片、羊毛交叉装片、英文字母装片等。

### 【实验原理】

光学显微镜,简称显微镜或光镜,是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的发明和使用已有 400 年的历史。1590 年前后,荷兰的 Hans 父子研制出了放大 10 倍的原始显微镜;1665 年,英国物理学家 Hooke 研制出性能较好的显微镜并用它发现了细胞。400 多年来,经不断改进,显微镜的结构和性能逐步完善,形成了品种繁多、型号各异的光学显微镜系列(图 1-1)。除了广泛使用的普通光镜外,还有相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜和倒置显微镜等具有特殊功能或用途的光镜。形形色色的光学显微镜虽然外形和结构差异较大,但其基本构造和工作原理是相似的。一台普通光学显微镜主要由机械系统和光学系统两部分构成,而作为显微镜核心部分的光学系统则主要包括物镜、目镜、聚光器和反光镜等部件。

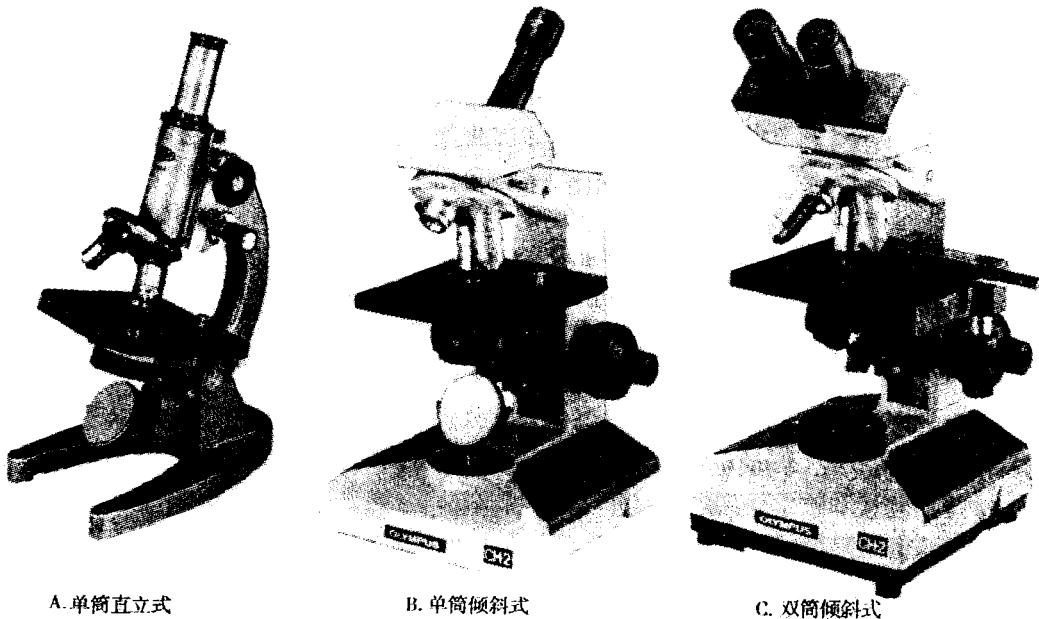


图 1-1 光学显微镜型号示例



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,但它们的作用都相当于一个凸透镜,由于被检标本是放在物镜下方的1~2倍焦距之间的,故物镜可使标本在物镜的上方形成一个倒立的放大实像,该实像正好位于目镜的下焦点(焦平面)之内,目镜进一步将它放大成一个虚像,通过调焦可使虚像落在眼睛的明视距离处,在视网膜上形成一个直立的实像。显微镜中被放大的倒立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25 cm处(图1-2)。

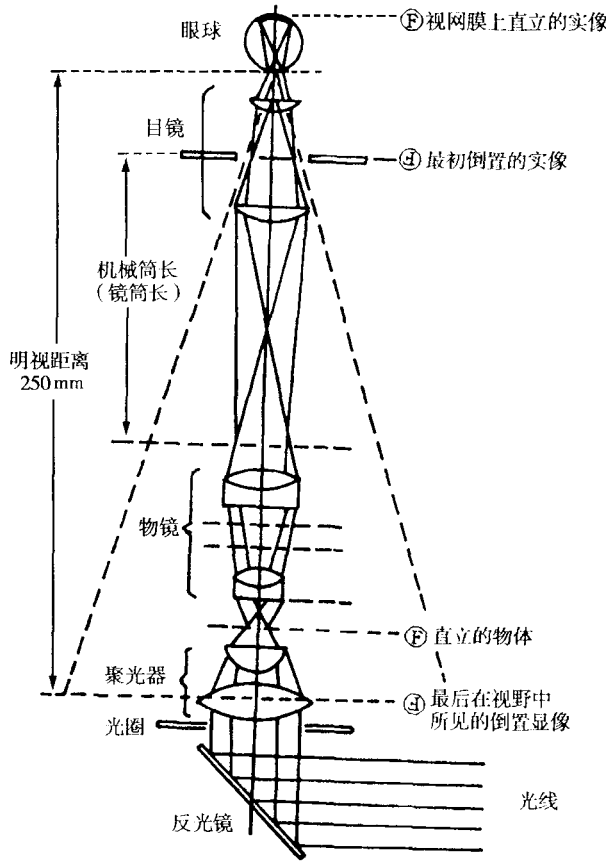


图1-2 光学显微镜的放大原理及光路图

一台显微镜的性能和质量的高低由多方面指标来反映,包括分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等性能指标。这些性能都有一定限度,彼此既相互作用又相互制约,改善或提高某方面的性能,往往会使另一性能降低。

分辨率是光镜最重要的性能指标,是指在25 cm的明视距离处,能区分被检物体上两个质点间的最小距离。因此,分辨率越小,说明分辨能力越高。据测定,人眼的分辨率约为100 μm,而光镜的分辨率可达0.2 μm。显微镜的分辨率由物镜的分辨率决定,物镜的分辨率就是显微镜的分辨率,而目镜与显微镜的分辨率无关,它只将物镜已分辨影像进行第二次放大。光镜的分辨率(R)可用下式计算:

$$R = \frac{0.61\lambda}{N.A.} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin(\alpha/2)}$$

式中λ为照明光源的波长,白光约为0.5 μm。N.A.代表数值孔径,也称镜口率,其数值等

于物镜和被检样品之间介质的折射率( $n$ )与镜口角( $\alpha$ )一半的正弦值的乘积,即  $N.A. = n \cdot \sin(\alpha/2)$ 。 $n$ 的最大值为 1.5,空气为 1,水为 1.33,油可达 1.5;镜口角是指位于物镜光轴上标本的一个点发出的光线延伸到物镜前透镜的有效直径的两端所形成的夹角,镜口角越大,进入物镜的光线越多, $\sin(\alpha/2)$ 的最大值为 1。 $N.A.$ 是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数。一般来说, $N.A.$ 值在干燥物镜(以空气为介质)为 0.05~0.95,水浸物镜为 0.1~1.20,油浸物镜(油镜)为 0.83~1.40。因此,光镜的最大分辨率为  $R = 0.61 \times 0.5 \mu\text{m} / 1.4 \approx 0.2 \mu\text{m}$ 。

由上式可知,物镜的数值孔径决定一台显微镜的主要光学性能:数值孔径越大,分辨率就越小,显微镜的分辨能力就越强,显微镜的光学性能也越好。但数值孔径与焦点深度(即当显微镜对标本的某一点或平面准焦时,焦点平面上下影像清晰的距离或范围)成反比,因此,并非数值孔径越大越好。物镜的数值孔径通常标刻在物镜的周缘。

放大率或放大倍数是光镜性能的另一重要参数,一台显微镜的总放大倍数等于目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积。常用光镜的最大放大倍数为 1 000 倍。

## 【内容与操作】

### 一、光学显微镜的基本结构与功能

#### (一)机械系统

1. 镜筒 是安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构,其上端装有目镜,下端与物镜转换器相连(图 1-3)。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式和双筒式两类。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种,而双筒光镜的镜筒均为倾斜式的。镜筒直立式光镜的目镜与物镜的中心线(光轴)在同一直线上,而镜筒倾斜式光镜的目镜与物镜的中心线成  $45^\circ$ 角,在其镜筒中装有能使光线折射  $45^\circ$ 的棱镜。

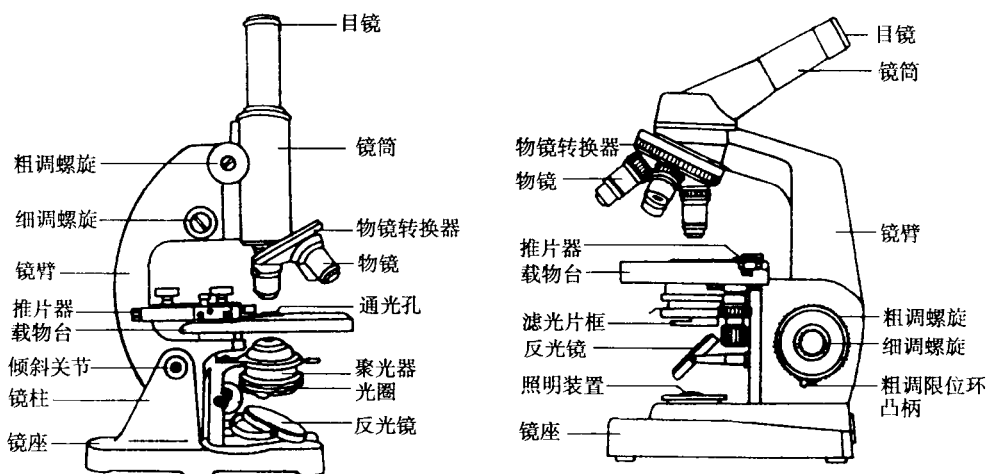


图 1-3 普通光学显微镜结构示意图

2. 物镜转换器 又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状结构,可以按顺时针或逆时针方向旋转,其上均匀分布有 3~4 个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。转动旋转盘可使不同的物镜到达工作位置(即与光路合轴),使用时注意凭手感使所需物镜准确到位。

3. 镜臂 是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时握持的部位。镜筒直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节,此关节可使镜筒向后倾斜一定角度以方便观察,

但使用时倾斜角度不应超过  $45^\circ$ , 否则, 由于重心偏移, 显微镜容易翻倒。

4. 调焦器 也称调焦螺旋, 是调节焦距的装置, 位于镜臂的上端(直立式镜筒)或下端(倾斜式镜筒), 分粗调螺旋(大螺旋)和细调螺旋(小螺旋)两种。粗调螺旋可使镜筒或载物台以较快速度或较大幅度升降, 能迅速调节好焦距, 使物像呈现在视野中, 适于低倍镜观察时的调焦。细调螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较小幅度地升降, 升或降的幅度不易被肉眼观察到, 适用于高倍镜和油镜的聚焦或焦距的精细调节; 也常用于观察标本的不同层次, 一般在粗调螺旋调焦的基础上使用。

有些类型的光镜, 粗调螺旋和细调螺旋重合在一起, 安装在镜柱的两侧。在右侧粗调螺旋的内侧有一窄环, 称为粗调松紧调节轮, 其功能是调节粗调螺旋的松紧度(向外转偏松, 向内转偏紧)。另外, 在左侧粗调螺旋的内侧有一粗调限位凸柄, 当用粗调螺旋调准焦距后向上推紧该柄, 可使粗调螺旋限位, 此时镜台不能继续上升, 但细调螺旋仍可调节。

5. 载物台 也称镜台, 是位于物镜转换器下方的方形平台, 用于放置被观察的玻片标本。载物台的中央有圆形的通光孔, 来自下方的光线经此孔照射到标本上。

在载物台上装有标本移动器, 也称推片器, 其上安装的弹簧夹用于固定玻片标本, 旋动推片器上的两个螺旋可使玻片标本前后左右移动, 寻找目标较为方便。

在推片器上附有纵、横游标尺, 用以确定标本的位置。游标尺由主标尺(A)和副标尺(B)组成, 副标尺的分度为主标尺的  $9/10$ 。使用时, 先看副标尺的 0 点位置, 再看主、副标尺刻度线的重合点, 依据重合点即可读出准确的数值。图 1-4 中所示的数值应为 26.4。

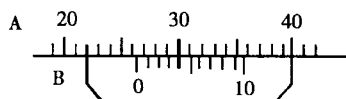


图 1-4 游标尺的用法

6. 镜柱 是连接镜臂与镜座的短柱。

7. 镜座 位于最底部, 是整套显微镜的基座, 用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源。

## (二) 光学系统

光学系统包括目镜、物镜、聚光器、反光镜等。

1. 目镜 又称接目镜, 安装在镜筒的上端, 起着将物镜所放大的物像进一步放大的作用。每个目镜一般由两个透镜组成, 在上下两个透镜(即接目透镜和会聚透镜)之间安装有能决定视野大小的金属光阑——视场光阑, 此光阑的位置即是物镜所放大实像的位置。因此, 可将一小段细金属丝或头发粘附在光阑上作为指针, 用以指示视野中的某一部分供他人观察。另外, 还可在光阑的面上安装目镜测微尺。每台显微镜通常配置 2~3 个不同放大倍数的目镜, 如“ $5\times$ ”、“ $10\times$ ”和“ $15\times$ ”(数字表示放大倍数)目镜, 可根据不同需要选择使用, 最常使用的是“ $10\times$ ”目镜。

2. 物镜 也称接物镜, 安装在物镜转换器上。每台光镜一般有 3~4 个不同放大倍数的物镜, 每个物镜由数片凸透镜组合而成, 是显微镜最主要的光学部件, 决定着光镜分辨力的高低。常用物镜的放大倍数有“ $10\times$ ”、“ $40\times$ ”(或“ $45\times$ ”)和“ $100\times$ ”等几种。一般将“ $10\times$ ”物镜称为低倍镜(而将“ $5\times$ ”及以下的叫做放大镜), 将“ $40\times$ ”或“ $45\times$ ”物镜称为高倍镜, 将“ $100\times$ ”物镜称为油镜(这种镜头在使用时其顶端需浸在香柏油中)。

在每个物镜的周缘通常都标有能反映其主要性能的参数(图 1-5),主要有放大倍数和数值孔径(如,10/0.25、40/0.65 和 100/1.25)、该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度(160/0.17,单位为 mm);另外,在油镜上还常标有“油”或“oil”字样。

在使用时,油镜需要用香柏油或石蜡油作为介质,这是因为玻璃与空气的折光率不同,光线通过载玻片和空气进入物镜,部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,使视野暗淡,物像不清;在玻片标本和油镜之间填充折射率与玻璃近似的香柏油或石蜡油(玻璃、香柏油和石蜡油的折射率分别为 1.52、1.51 和 1.46,空气为 1),可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨率。物镜分辨率的大小取决于物镜的数值孔径,其数值越大,分辨率越高。

不同物镜有不同的工作距离,所谓工作距离是指显微镜处于工作状态(焦距调好、物像清晰)时,物镜最下端与盖玻片上表面之间的距离(图 1-5)。物镜的放大倍数与其工作距离成反比。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需旋动细调螺旋,便可见到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。不同放大倍数的物镜可从外形上加以区分,一般来说,低倍镜最短,油镜最长,而高倍镜的长度介于两者之间。

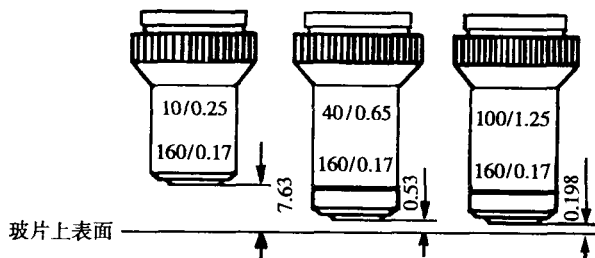


图 1-5 物镜的性能参数及工作距离  
注:两箭头间距离为工作距离,单位为 mm

3. 聚光器 位于载物台通光孔的下方,由聚光镜和光圈构成,其主要功能是将光线集中到所要观察的标本上。聚光镜由 2~3 个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的左下方,有一调节螺旋,可使其上升或下降,从而调节光线的强弱,升高聚光器可使光线增强,反之则光线变弱。

光圈也称彩虹光阑或孔径光阑,位于聚光器的下端,是能够控制进入聚光镜光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成,其外侧有一小柄,可使光圈的孔径开大或缩小,以调节光线的强弱。在有的显微镜,光圈的下方还装有滤光片框,可放置不同颜色的滤光片。

4. 反光镜 位于聚光镜的下方,可向各方向转动,能将来自不同方向的光线反射到聚光器中。反光镜有两个面:一面为平面,另一面为凹面。凹面镜有聚光作用,适于较弱光和散射光下使用;光线较强时则选用平面镜。

## 二、光学显微镜的使用方法

### (一)准备工作和基本要求

取用显微镜时,应右手握住镜臂,左手托住镜座,将显微镜平稳地放置在实验台上,镜座后缘离台边缘约 6 cm。

镜筒直立式光镜,可使镜筒倾斜一定角度以方便观察,但倾斜角度不应超过  $45^\circ$ ,否则显微镜重心不稳,容易倾倒。

观察显微镜时,要求双眼同时睁开,双手并用;逐步养成左眼观察、右眼看图(边观察边绘

图时),左手调焦、右手移片或绘图记录的良好习惯。

## (二)低倍镜的使用

1. 调光 打开实验台上的工作灯,转动粗调螺旋,使镜筒稍升高(或使载物台稍下降),调节物镜转换器,使低倍镜转到工作状态(即低倍镜头对准通光孔),当镜头完全到位时,可听到轻微的顿挫声。

打开光圈并使聚光器上升到适当位置(以聚光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度为宜),然后左眼观察目镜(注意勿闭右眼),同时调节反光镜的角度,使视野内的光线均匀、亮度适中。

2. 放片 取需要观察的玻片标本,先对着光线用肉眼观察标本的全貌和位置;再将其放置到载物台上,用推片器上的弹簧夹固定好,注意应使有盖玻片或有标签的一面朝上;然后,旋动推片器的螺旋,使需要观察的标本部位处于通光孔的中央位置。

3. 调焦 用眼睛从侧面注视低倍镜,同时用粗调螺旋使镜头下降(或载物台上升),直至低倍镜头距玻片标本的距离约0.5 cm(注意操作时必须从侧面注视镜头与玻片的距离,以避免镜头压坏玻片);然后,左眼观察目镜,同时用左手慢慢转动粗调螺旋使镜头上升(或使载物台下降)直至视野中出现物像为止;最后,转动细调螺旋,使视野中的物像清晰。此种状态称为准焦状态,调焦的过程也称准焦。

如果需观察的物像不在视野中央,甚至不在视野内,可用推片器前后、左右移动标本片,使物像进入视野并移至中央。在调焦时,如果镜头与玻片的距离已超过了1 cm 还未见到物像,应严格按上述步骤重新操作。

## (三)高倍镜的使用

在使用高倍镜前,应先用低倍镜寻找到需观察的物像,并将其移至视野中央,同时转动细调螺旋,使被观察的物像清晰。

转动物镜转换器,使高倍镜转到工作状态(高倍镜头对准通光孔),此时,视野中一般可见到不太清晰的物像,只需调节细调螺旋便可使物像清晰。

有时在低倍镜准焦状态下,直接转换高倍镜时会发生高倍物镜碰擦玻片,而使高倍镜不能转换到位的情况。此时不能硬转,应检查玻片是否放反、玻片是否过厚以及物镜是否松动等情况。如果排除这些因素后,仍不能转换,则属高倍镜镜头过长。此时应将载物台下降或使镜筒升高,然后再转换,并在眼睛的注视下使高倍镜接近盖玻片,边观察目镜边用粗调螺旋缓慢地使载物台下降或使镜筒升高,看到物像后再用细调螺旋准焦。

由于制造工艺上的原因,许多显微镜的低倍视野中心与高倍镜视野中心往往存在一定的偏差。因此,在从低倍镜转换到高倍镜观察标本时,常会给观察者迅速找到标本造成一定困难。解决这个问题的方法是:利用羊毛交叉装片来测定所用光镜的偏心情况并绘图记录制成偏心图,依据偏心图,指导高倍镜的使用。具体操作步骤是:在高倍镜下找到羊毛交叉点并将其移至视野中央,换低倍镜观察羊毛交叉点是否还位于视野中央;如果偏离中央,其所在的位置就是偏心位置。将以上两个步骤反复操作几次,找出准确的偏心位置并绘出偏心图。在使用该显微镜的高倍镜观察标本前,应在低倍镜下将需进一步放大的部位移至偏心位置,再转换高倍镜观察,这样,所需观察的目标就正好处在视野中央了。

## (四)油镜的使用

用低倍镜或高倍镜找到所需观察的标本物像,并将需要进一步放大的部位移至视野中央。将聚光器上升至较高位置并将光圈开至最大(油镜所需光线较强)。转动物镜转换器,移开低

倍镜或高倍镜,在玻片标本上需观察的部位滴一滴香柏油作为介质,然后在眼睛的注视下,使油镜转至工作状态,此时油镜的下端应正好浸在油滴中或与油滴接触。有的显微镜油镜头过长,油镜头不能转至工作状态,此时,可先稍稍下降载物台或上升镜筒,再使油镜头转至工作状态,使油镜头下端浸入油滴中。

左眼注视目镜,同时小心而缓慢地转动细调螺旋使载物台下降或使镜头微微上升,直至视野中出现清晰的物像。操作时不要反方向转动细调螺旋,以免镜头下降压碎标本或损坏镜头。在观察时,如需同老师或同学讨论视野中的某一结构,可用推片器将该结构移至指针尖端处;如果镜中未装指针,可将视野看成一个周缘带有刻度的钟面(如3点、6点、9点、12点等),说明该结构位于钟面的几点钟位置。

油镜使用结束后,必须及时将镜头上的油擦拭干净。擦拭前,应将镜筒升高约1 cm并将油镜头转离通光孔;擦拭时,先用擦镜纸蘸少许二甲苯擦2次,再用干净的擦镜纸擦1次。至于玻片上的油,如果是有盖玻片的永久制片,可直接用上述擦油镜头的方法擦净;如果是无盖玻片的标本,则用拉纸法除去载玻片上的油,即先把一小片擦镜纸盖在油滴上,再往纸上滴几滴二甲苯,趁湿将纸往外拉,如此反复几次即可将玻片上的油除去。

#### (五)注意事项

取用显微镜时,应轻拿轻放。较长距离移动显微镜时,应一手紧握住镜臂,另一手托住镜座;不要用单手提拿,以避免零部件滑落。

显微镜不可放置在实验台的边缘,应使镜座后缘离台边缘约6 cm。课间离开座位时,应将倾斜关节复原,镜头转离通光孔位置。

在使用镜筒直立式显微镜时,镜筒倾斜的角度不应超过 $45^\circ$ ,以防重心后移、显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时,镜筒不应倾斜,以避免由于载物台的倾斜而使液体流到载物台上。

不可随意拆卸显微镜上的零部件,以免丢失或损坏;目镜也不要随便取出,以防灰尘落入镜筒内。

要经常保持显微镜的清洁,显微镜的光学部分只能用擦镜纸轻轻擦拭,不可用纱布、手帕、普通纸张或手指擦试,以避免磨损镜面。

使用显微镜观察标本时,要养成两眼同睁、双手并用(左手操纵调焦螺旋,右手操纵推片器)的习惯,必要时应一边观察、一边计数或绘图记录。如果两眼同睁观察不习惯,可先用手挡住右眼,等左眼看清视野后再逐渐放开右眼,反复练习后便可达到要求。观察时,双眼同睁既可防止眼睛疲劳,又方便绘图。

使用显微镜,特别是使用油镜时,不能一边在目镜中观察,一边上升载物台或下降镜筒,以避免镜头与玻片相撞,损坏镜头或玻片标本。

显微镜使用结束后应及时复原,使其处于非工作状态:先上升镜筒或下降载物台,取下标本片,物镜转离通光孔(镜筒倾斜的显微镜,恢复直立状态);然后,下降镜筒或上升载物台,使物镜与载物台相接近;使反光镜处于垂直位,下降聚光器,关闭光圈。最后,将显微镜放回镜箱中或送还显微镜室。

### 三、操作练习

取血涂片、英文字母装片、羊毛交叉装片或其他标本片,按照上述操作程序反复练习低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。

血涂片上的的血膜经瑞氏染料染色后呈蓝紫色,将蓝紫色的血膜对着通光孔,低倍镜下,调焦后可看到大量密集的红细胞及少量散在的白细胞、血小板。换用高倍镜或油镜仔细观察:红细胞无核、中央色淡;白细胞均有核,核形态不一;血小板较小,形态不规则,由巨核细胞的胞质脱落而来(图 1-6)。观察字母装片时,先用肉眼直接观察一下字母的方位和大小,然后放到低倍镜下观察。视野中字母的方位发生了什么变化?标本移动的方向与视野中物像移动的方向有何不同?观察羊毛交叉装片时,先在低倍镜下仔细观察两根羊毛的交叉点,将交叉点移至视野中央后换用高倍镜观察,利用细调螺旋分别对两根羊毛进行准焦,分辨出两根羊毛的上下位置。如果低倍视野中心与高倍视野中心存在偏差,可按以上介绍绘制偏心图的方法来解决。

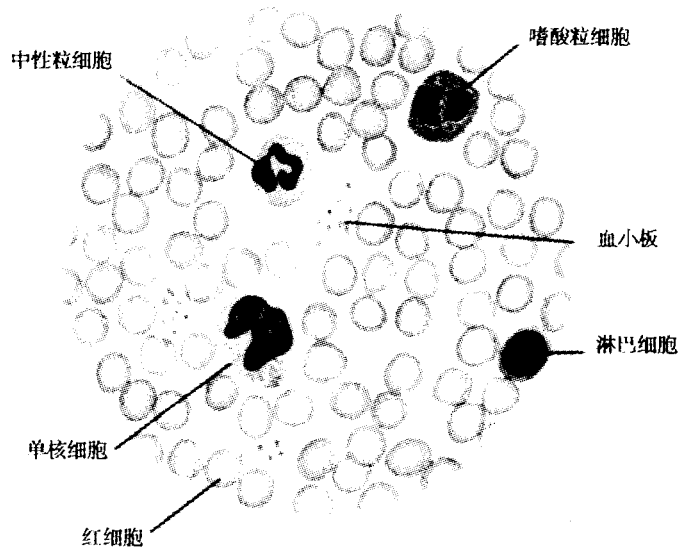


图 1-6 人血细胞

**【思考题】**

1. 使用显微镜观察标本时,为什么必须按从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?
2. 在调焦时,为什么要先将低倍镜与标本表面的距离调节到 0.5 cm? 而油镜则先使其贴近标本表面?
3. 如果标本放反了,可用高倍镜或油镜找到标本吗?
4. 怎样才能准确而迅速地在高倍镜或油镜下找到目标?
5. 如果细调螺旋已转至极限而物像仍不清晰,应该怎么办?
6. 如何判断视野中所见到的污点的来源? 目镜在显微镜的成像上起什么作用?

**【实验报告】**

填图:标注显微镜的部件名称。

**【附】特殊光学显微镜原理简介**

1. 荧光显微镜 荧光显微镜是目前在光镜水平对特异蛋白质等生物大分子定性、定位的有力工具。其基本原理是:利用一个高发光效率的点光源,经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光,激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后,再通过物镜和目镜的放大进行观察。在强烈的对衬背景下,即使荧光很微弱也能辨认,敏感性高。

荧光显微镜由普通光学显微镜及一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断片等)组成。荧光光源一般采用高压汞灯(50~200 W),它可发出各种波长的光,但每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长,所以需加用激发滤片(一般有紫外、紫色、蓝色和绿色等激发滤片),仅使一定波长的激发光透过照射到标本上,而将其他光都吸收掉。每种物质被激发光照射后,在极短时间内发射出较照射波长更长的可见荧光。荧光具有专一性,一般都比激发光弱,为能观察到专一的荧光,在物镜后面需加阻断(或压制)滤光片。它的作用有二:一是吸收和阻挡激发光进入目镜,以免干扰荧光和损伤眼睛;二是选择并让特异的荧光透过,表现出专一的荧光色彩。两种滤光片必须选择配合使用。

2. 激光扫描共焦显微镜 普通荧光显微镜下,许多来自焦平面以外的荧光使观察到的图像反差和分辨率降低;而激光扫描共焦显微镜则大大减少这种焦平面以外的光,它在某一瞬间只用很小一部分光照明,这一束光通过检测器前的一个小孔或裂缝后成像,保证只有来自该焦平面的光成像,而来自焦平面以外的散射光则被小孔或裂缝挡住,这样所成的像异常清晰。激光扫描共焦显微镜的分辨率可以比普通荧光显微镜的分辨率提高1.4~1.7倍。所谓共焦是指物镜和聚光镜同时聚焦到同一个小点,即它们互相共焦点。激光扫描共焦显微镜比普通显微镜有诸多好处:由于可自动改变观察的焦平面,而且纵向分辨率得到改善,所以可以通过“光学切片”观察较厚样品的内部结构;改变焦点可获得一系列细胞不同切面上的图像,经叠加后便可重构出样品的三维结构。激光扫描共焦显微镜在研究亚细胞结构与组分等方面的应用越来越广泛。

3. 相差显微镜和微分干涉显微镜 光线通过不同密度的物质时,其滞留程度不同,密度大则光的滞留时间长,密度小则光的滞留时间短。所以,在相差显微镜中可将这种光程差或相位差转换成振幅差。相差显微镜与普通光学显微镜最主要的不同点是在物镜后装有一块“相差板”,偏转的光线分别通过相差板的不同区域,由于相差板上部分区域有吸光物质,所以又使两组光线之间增添了新的光程差,从而对样品不同密度造成的相位差起“夸大”作用。最后这两组光线经过透镜又会聚成一束,产生互相叠加或抵消的现象,从而表现出肉眼明显可见的明暗区别。由于反差是以样品中的密度差别为基础形成的,故相差显微镜的样品不需染色,可以观察活细胞,甚至可观察到细胞核、线粒体等细胞器的动态。

微分干涉显微镜用的是平面偏振光。这些光经棱镜折射后分成两束,在不同时间经过样品的相邻部位,然后再经过另一棱镜将这两束光汇合。这样,样品中厚度上的微小区别就会转化成明暗区别,增加了样品反差并且具有很强的立体感。微分干涉显微镜更适于研究活细胞中较大的细胞器。将微分干涉显微镜接上录像机可以观察活细胞中的颗粒及细胞器的运动。用计算机辅助的微分干涉显微镜可以得到很高的反差,使一些精细结构(如单根微管等)也可以在光镜下分辨出来。其分辨率比普通光镜提高一个数量级,不仅填充了普通光镜与电镜之间分辨范围上的间隙,而且使在高分辨率下研究活细胞成为可能。比如,应用这一原理的录像增差显微镜技术可以观察微管上颗粒的运动。



## 第二节 细胞的形态、计数及显微测量

### 【目的与要求】

1. 初步掌握临时制片技术和显微绘图的方法。
2. 熟悉光镜下动、植物细胞的基本形态、结构。
3. 掌握活细胞计数及显微测微尺的使用方法。

### 【器材与试剂】

1. 显微镜、载玻片、盖玻片、血细胞计数板、目镜测微尺、镜台测微尺、吸水纸、擦镜纸、纱布、牙签、镊子、剪刀、滴管。
2. 洋葱、雄性小白鼠、蟾蜍。
3. 0.5%次甲基蓝、Ringer液、1%碘液。

### 【实验原理】

1. 细胞计数时,先将培养细胞或血细胞稀释成细胞悬液,然后将细胞悬液滴入细胞计数板内,计数计数板上计数室四大格内的细胞数。根据计数室的容积及稀释倍数,即可计算出细胞浓度。

2. 测微尺分为目镜测微尺(简称目尺)和镜台测微尺(简称台尺),进行显微测量时,两者要配合使用。由于目尺刻度的长度随物镜放大倍数的不同而有改变,故用目尺测量细胞前先要确定目尺刻度的长度。根据相同长度的台尺刻度(已知)与目尺刻度的比例即可知道目尺刻度的长度。根据目尺测出的圆球形细胞的半径( $R$ )或椭圆形细胞的长径( $a$ )、短径( $b$ ),代入相应公式即可计算出细胞体积和核质的比例。

### 【内容与操作】

## 实验一 临时制片方法及细胞形态的观察

### (一) 人口腔黏膜上皮细胞制片与观察

取一载玻片,用左手拇指与示指夹持载玻片两端,右手用清洁纱布将载玻片擦净。再用同样方法轻轻将一片盖玻片擦净。注意盖玻片薄而脆,擦拭时用力要小而均匀。将擦净后的盖玻片和载玻片放在干净的纸上备用。

在清洁的载玻片中央滴1滴0.5%次甲基蓝染液,然后用消毒牙签的钝端轻轻刮取颊部内侧的口腔黏膜上皮细胞,将带有上皮细胞的牙签与玻片平行放在染液中,来回滚动数次,以使细胞落入染液中,染色2~3分钟后,用镊子夹取擦净的盖玻片,使其一侧边缘与载玻片上的染液接触,慢慢盖下,以防气泡的产生。如盖玻片周围有多余的染液,可用吸水纸吸去。

将标本片放在显微镜的载物台上,先用低倍镜寻找细胞,可见口腔黏膜上皮细胞染成蓝色,成群或散在分布,大多呈扁椭圆形或多边形。高倍镜下,可见细胞中央有一被染成深蓝色的细胞核,细胞核与细胞膜间为均匀一致的细胞质(图1-7)。

### (二) 洋葱表皮细胞的制片与观察

取一擦净的载玻片,滴1滴1%碘液;将洋葱嫩茎用小刀切成小块,取1块肉质鳞叶,用镊