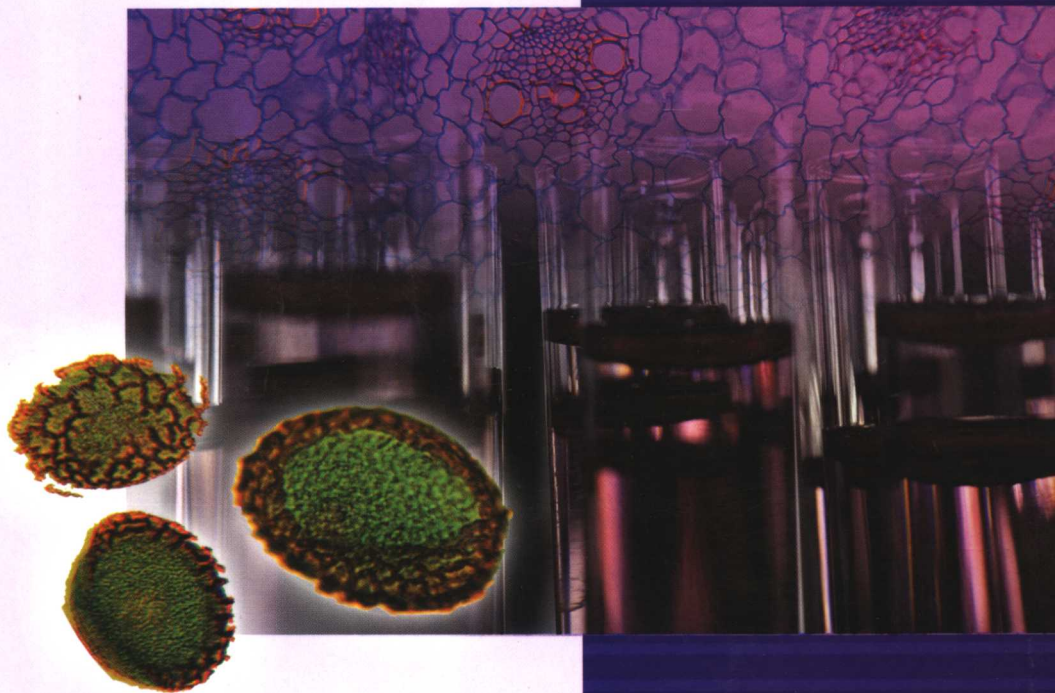




细胞生物学实验原理与技术

XIBAO SHENGWUXUE SHIYAN YUANLI YU JISHU

主 编 姜 静



东北林业大学出版社

细胞生物学

实验原理与技术

主编 姜 静

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞生物学实验原理与技术/姜静主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2004.3

ISBN 7-81076-538-8

I. 细... II. 姜... III. 细胞生物学—实验 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 013257 号

责任编辑: 任丹婷

封面设计: 彭 宇



NEFUP

细胞生物学实验原理与技术

Xibao Shengwuxue Shiyuan Yuanli Yu Jishu

主 编 姜 静

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈尔滨市工大节能印刷厂印装

开本 787 × 1092 1/16 印张 6.25 字数 130 千字

2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-538-8

Q·103 定价: 10.00 元

编 委

主编：姜 静

参编：王大海 王 超 朱 宏 吕艳芳
李慧玉 李淑娟 金顺玉 董京祥
魏继承 褚延广

前 言

细胞是生物体的形态结构和生命活动的基本单位。细胞学是研究细胞的结构、功能和生活史的科学。随着科学技术的发展,把细胞的整体活动水平、亚细胞水平和分子水平三个层面的研究有机地结合起来,以动态的观点来考察细胞和细胞器的结构和功能,探索细胞的基本生命活动。它不仅仅孤立地研究一个细胞、生物大分子和小分子,以及生命活动现象,而是研究它们的变化过程,研究它们之间的相互关系以及它们与环境之间的相互关系。它的研究范围大大超过了过去的细胞学。因此,细胞学被改用新的名称,即细胞生物学。随着分子生物学的发展及相关知识对细胞生物学的渗入,现代细胞生物学也有人称其为细胞分子生物学。细胞生物学是生命科学研究的基础,因此,生物学上的许多基本问题,必须在细胞中谋求解决。本实验教材紧随细胞生物学的发展,把细胞的整体活动水平、亚细胞水平和分子水平三个层面的研究有机地结合起来,以动态的观点来研究细胞和细胞器的结构和功能,以生动的实验资料来描述细胞的基本生命活动,如生长、发育、代谢、遗传变异和进化等基本规律。

《细胞生物学实验原理与技术》一书是编者多年的教学和科研的经验总结,同时参阅了大量的文献和著作,以传统的细胞生物学实验为主线,渗入现代分子细胞生物学的实验内容。本实验教程旨在为大中专院校生物系、农、林及医学院开设的细胞生物学实验提供教学用书。

《细胞生物学实验原理与技术》一书所用的插图和照片,除个别是从其他书刊借用外,大部分是编者在多年的教学科研工作中积累的,这是本教材的一大特点。

由于时间仓促以及我们的水平有限,教材中可能会有不妥之处,希望各位同仁给予批评指导,我们将不胜感激。

作 者

2004年1月于哈尔滨

目 录

实验一 普通光学显微镜的结构及其使用·····	(1)
实验二 特殊显微镜的结构及其使用·····	(9)
实验三 细胞形态结构的观察·····	(26)
实验四 细胞器的光学显微镜观察·····	(31)
实验五 细胞内 DNA 和 RNA 的原位显示 ·····	(35)
实验六 细胞内 DNA 的 Feulgen 反应·····	(38)
实验七 植物细胞中碱性蛋白与总体蛋白的定位·····	(40)
实验八 细胞中过氧化物酶类、脂类和碳水化合物的鉴定·····	(42)
实验九 植物细胞骨架的显示与观察·····	(46)
实验十 叶绿体的分离与观察·····	(49)
实验十一 线粒体的分离与观察·····	(51)
实验十二 植物可溶性蛋白的分离·····	(53)
实验十三 可溶性蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术·····	(56)
实验十四 细胞分裂的观察·····	(60)
实验十五 植物组织培养·····	(66)
实验十六 植物细胞的悬浮培养·····	(70)
实验十七 根癌农杆菌介导的植物细胞的遗传转化·····	(73)
实验十八 植物染色体荧光原位杂交技术·····	(77)
附录 ·····	(83)
主要参考文献·····	(91)

实验一 普通光学显微镜的结构及其使用

一、实验目的

第一，熟悉普通光学显微镜的主要构造及其原理。

第二，掌握低倍镜、高倍镜以及油镜的使用方法。

第三，了解光学显微镜的维护方法。

二、实验原理

光学显微镜 (light microscope) 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 多年的历史。1590 年前后，荷兰的汉斯 (Hans) 父子创制了放大 10 倍的原始显微镜。1665 年英国物理学家虎克 (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。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，但其基本的构造和工作原理是相似的。一台普通光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光源物镜、目镜、聚光镜和光源等部件。那么，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，该实像看起来好像在离眼睛 25 cm 处（图 1-1）。

一台显微镜的性能和质量的高低可由其各方面的指标来反映，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 (resolving power) 是光镜最重要的性能指标，也称分辨本领，是指显微镜或人眼在 25 cm 的明视距离处，能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力，即分辨出标本上相互接近的两点间的最小距离的能力。据测定，人眼的分辨率约为 $100\ \mu\text{m}$ ，而光镜的分辨率可达 $0.2\ \mu\text{m}$ 。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，它只将物镜已分辨的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 ——照明光源的波长，白光约为 $0.5\ \mu\text{m}$ ；

N.A.——镜口率；

n ——介质的折射率；

α ——镜口角， $\sin\alpha/2$ 的最大值为 1， n 的最大值为 1.5。

将这些数值代入公式，得到光镜的最大分辨率为 $R = 0.61 \times 0.5\ \mu\text{m} / 1.5 = 0.2\ \mu\text{m}$ 。

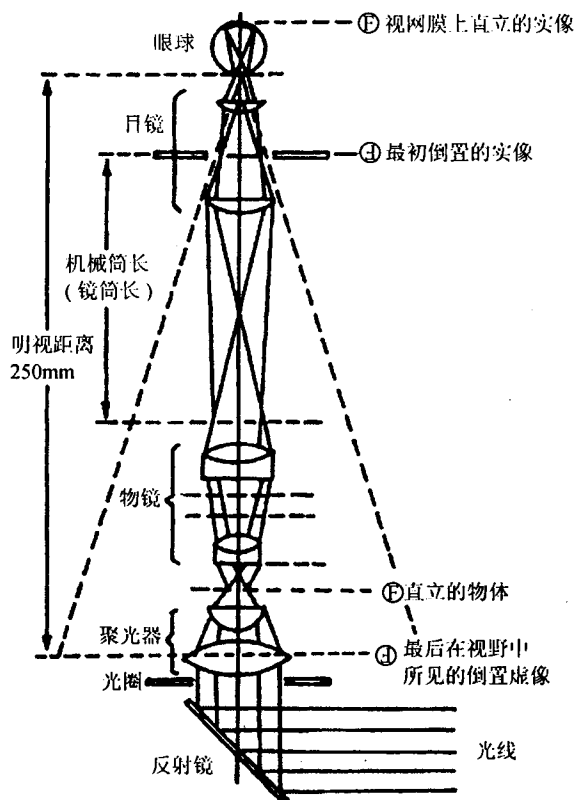


图 1-1 光学显微镜的放大原理及光路图

(引自《医学细胞生物学实验与习题》赵刚，2000)

镜口率即数值孔径 (numerical aperture, N.A.)，是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数。N.A. 等于物镜和被检样品之间的介质的折射率 (n) 与物镜所接受光锥的顶角 (α ，即镜口角) 一半的正弦值的乘积，用公式表示为 $N.A. = n \cdot \sin\alpha/2$ 。

镜口角 α 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 (即标本对物镜镜口张角的半角)。物镜与标本之间介质的折射率，空气为 1，水为 1.33，油为 1.5 左右。

从 N.A. 的公式可以得知，镜口角越大，进入物镜的光线越多；介质的折射率越大，则数值孔径越大。一般来说，干燥物镜 (以空气为介质) 的 N.A. 值为 $0.05 \sim 0.95$ ，水浸物镜为 $0.1 \sim 1.20$ ，油浸物镜 (油镜) 为 $0.83 \sim 1.40$ 。

物镜的数值孔径决定一台显微镜的主要光学能力，与分辨率成正比，N.A. 越大，

显微镜的能力越强,但 N.A. 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。各种物镜的数值孔径数值一般标刻在其外壳上。

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。常用显微镜的最大放大倍数一般为 1 600 倍。

光学显微镜是生物科学和医学研究领域常用的仪器,它在细胞生物学、组织学、病理学、微生物学及其他有关学科的教学科研工作中有着极为广泛的用途,是研究人体及其他生物机体组织和细胞结构强有力的工具。

三、实验器具与试剂

普通光学显微镜、擦镜纸、香柏油或液体石蜡(石蜡油)、血涂片、清洁剂(乙醚 7 份+无水乙醇 3 份)。

四、实验内容与步骤

(一) 光学显微镜的基本构造及功能(图 1-2)

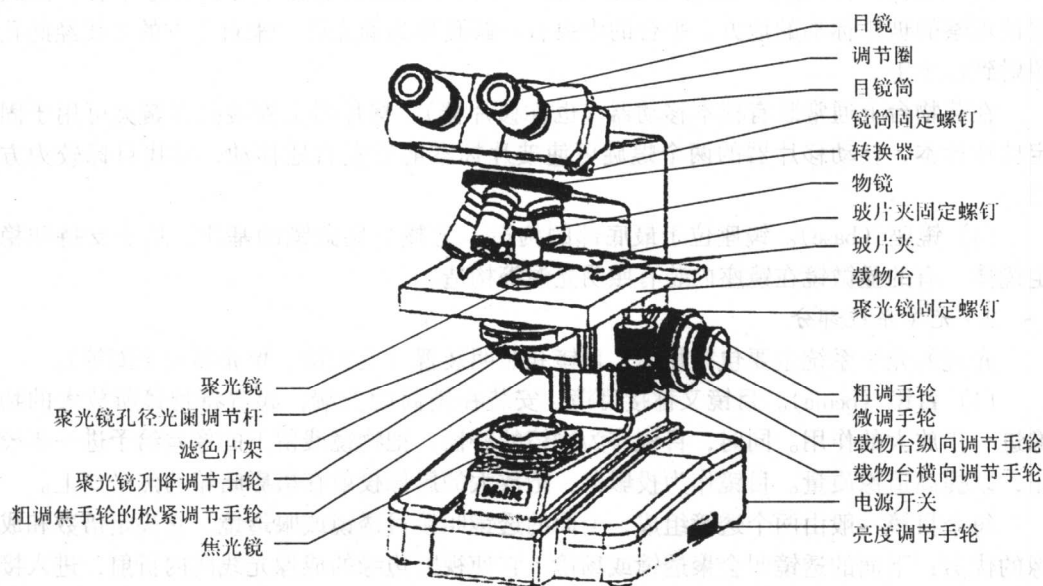


图 1-2 普通双筒光学显微镜示意图

(二) 主要机械部分

1. 镜筒 (tube)

镜筒为安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构,其上端可装载目镜,下端与物镜转换器相连。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,而双筒式光镜的镜筒均为倾斜的。镜筒直立式光镜与物镜的中心线

(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互成 45° 角,在其镜筒中装有能使光线转折 45° 的棱镜。

显微镜的机械筒长,主要有两种标准,即 160 mm 和 170 mm,用数字刻在镜壳上,如 160, 170。 ∞ 表示机械筒长为无限大,为某些特种显微镜的筒长。机械筒长是指从镜筒的目镜管上缘至物镜螺旋肩的距离,以毫米表示。

(1) 物镜转换器 (revolving nose - piece)。物镜转换器又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状构造,可以按顺时针或逆时针方向自由旋转,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。

(2) 调焦器 (focusing adjustment)。调焦器也称调焦螺旋,为调节焦距的装置,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。而细调螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较小幅度地升降(升或降的距离不易被肉眼观察到),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。

(3) 载物台 (stage)。载物台也称平台,是位于物镜转换器下方的方形平台,是放置被观察的玻片标本的地方。平台的中央有一圆孔称为通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。

在载物台上通常装有标本移动器(也称移片器),移片器上安装的弹簧夹可用于固定玻片标本,转动移片器的两个螺旋可使玻片标本前后左右地移动,寻找目标较为方便。

(4) 镜座 (base)。镜座位于最底部的构造,为整个显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

2. 光学系统部分

光镜的光学系统主要包括物镜、目镜和照明装置(反光镜、聚光器和光圈等)。

(1) 目镜 (ocula)。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。同时,目镜作为物镜的补偿,把物镜残留下的像差给予进一步校正,以提高造像质量。目镜作为投影器,把放大的影像投射在摄影暗箱的焦平面上。

每个目镜一般由两个透镜组成,上面的透镜叫接目透镜或眼透镜,它决定倍数和成像的优劣;下面的透镜叫会聚透镜或场镜,它使视野边缘的成像光线向内折射,进入接目透镜中,使物体的影像均匀明亮。在上下两透镜(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,故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 个不同放大倍率的目镜,常见的有 $5\times$ 、 $10\times$ 和 $15\times$ ($\times$ 表示放大倍数)的目镜,可根据不同的需要选择使用,最常使用的是 $10\times$ 目镜。由接目透镜射出的成像光线基本上为平行光束,并在目镜之上约 10 mm 处交叉,此交叉点称做出射光瞳。

镜检观察,通过目镜所窥视的圆,即目镜光阑所围绕的范围,称做视场 (field

view)。视场圆的直径叫做视场宽度，多用毫米表示。视场宽度与显微镜总放大率成反比，与物镜的放大率亦成反比。

(2) 物镜 (objective)。物镜也称接物镜，安装在物镜转换器上。每台光学显微镜一般有 3~4 个不同放大倍率的物镜，每个物镜由数片凸透镜和凹透镜组合而成，是显微镜最主要的光学部件，决定着光学显微镜分辨率的高低，显微镜的质量主要取决于它。常用物镜的放大倍数有 $10\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ 等几种。一般将 $8\times$ 或 $10\times$ 的物镜称为低倍镜（而将 $5\times$ 以下的叫做放大镜）；将 $40\times$ 或 $45\times$ 的称为高倍镜；将 $90\times$ 或 $100\times$ 的称为油镜（这种镜头在使用时其顶端需浸在油中）。

在每个物镜上通常都刻有能反映其主要性能的参数，根据参数的不同主要有以下几种物镜，如图 1-3 所示。

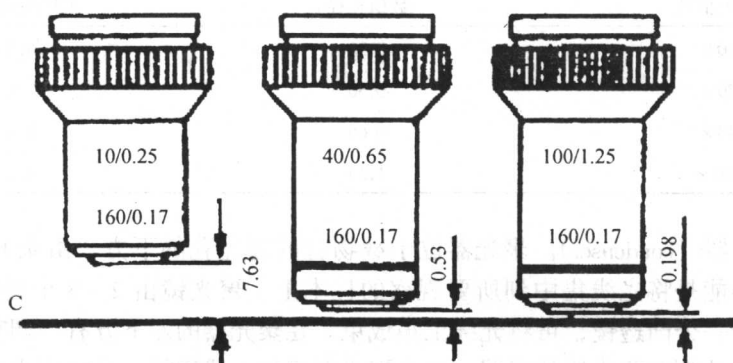


图 1-3 物镜的性能参数及工作距离

c 线为盖玻片的上表面； $10\times$ 物镜工作距离为 7.63 mm； $40\times$ 物镜为 0.53 mm；

$100\times$ 物镜为 0.198 mm (XSB-02 型显微镜)；10/0.25、40/0.65 和 100/1.25 表示镜头放大倍数和数值孔径；

160/0.17 表示显微镜机械筒长（标本至目镜的距离）和标准盖玻片厚度，即筒长 160 mm，盖片厚度 0.17 mm

（引自《医学细胞生物学实验与习题》赵刚，2000）

物镜的数值孔径 (numerical aperture)，通常简写为 N.A.，其值多用数字刻在物镜外壳上，如 0.25、0.65 和 1.3 等。常和放大倍数写在一起，如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.25 等。

根据物镜的种类不同，镜检时在被检标本（或样品）上加或不加盖玻片。凡需加用盖玻片的物镜，在外壳上刻有需盖玻片的厚度 (mm)，如 0.17 mm。刻值常与机械筒长写在一起如 160/0.17。160/0 或 160/表示：筒长 160 mm，盖片厚度为 0，即不需加用盖玻片（绝对不用盖玻片）。160/- 表示：筒长 160 mm，盖片有无皆可。 $\infty/0$ 或 $\infty/-$ ：筒长为无限大，盖玻片厚度为零或有无皆可。

在油镜上还常标有“油”或“oil”字样。油镜在使用时需要用香柏油或石蜡油作为介质，这是因为油镜的透镜和镜孔较小，而光线要通过载玻片和空气才能进入物镜中，玻璃与空气的折光率不同，使部分光线产生折射而损失掉，导致进入物镜的光线减少。而使视野暗淡，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时（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, 则表示分辨率越高。

不同的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。物镜的放大倍数与其工作距离成反比(表 1-1)。当低倍镜被调节到工作距离后, 可直接转换高倍镜或油镜, 只需用细调螺旋稍加调节焦距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也可从外形上加以区别, 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。

表 1-1 标准物镜的性质

放大倍数	数值孔径	工作距离/mm
10×	0.20	6.5
20×	0.50	2.0
40×	0.65	0.6
100×	1.25	0.2

(3) 聚光器(condenser)。聚光器位于载物台的通光孔的下方, 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。

光圈也称为孔径光阑, 位于聚光器的下端, 是一种能控制进入聚光器的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。在光圈的下方常装有滤光片框, 可放置不同颜色的滤光片。

聚光器有不等的焦距, 高倍物镜需用焦距较小的聚光器, 低倍物镜需用焦距较大的聚光器。如用低倍物镜, 没有与其相应的长焦距的聚光器时, 可取下或旋出聚光器的上透镜, 以提高焦距值, 扩大视野。例如, 一般的聚光器焦距可能为 1.2 mm, 移开上透镜后, 焦距可增至 5.5 mm。

聚光器调中、准焦后, 孔径光阑的开孔要适度。开度过小使聚光器和物镜的数值孔径下降, 影响影像的分辨率, 还可能产生光的衍射, 降低成像质量。光孔过大, 造成光线充溢, 引起产生眩光, 降低影像的清晰度和反差。聚光器孔径光阑的开孔的最大限度是等同于物镜的光孔。

在镜检观察、显微摄影时, 为提高影像的清晰度和反差, 聚光器的孔径光阑不能开大, 开度过大时, 聚光器会出现球差和色差, 因为透镜的边缘残存的像差较中心为大。

(4) 集光镜(reflection mirror)。集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。

(三) 光学显微镜的使用方法

1. 准备工作及观察要求

(1) 将显微镜小心地从镜箱中取出(较长距离移动显微镜时应以右手握住镜臂,左手托住镜座),放置在实验台的偏左侧,以镜座后端离实验台边缘3~6 cm为宜。

(2) 检查镜的各个部件是否完整和正常。

(3) 使用显微镜观察标本时,要求左手调焦、右手移片或绘图记录。

2. 低倍镜的使用方法

(1) 取1张玻片标本,先对着光线用肉眼观察标本的全貌和位置,再将玻片标本放置到载物台上,注意使有盖玻片或标签的一面朝上。然后转动移片器的螺旋,使需要观察的标本部位对准物镜。

(2) 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小于6 mm(注意操作时必须从侧面注视镜头与玻片的距离,以避免镜头碰破玻片)。然后在目镜上观察,同时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,再转动细调螺旋,使视野中的物像最清晰。

如果需观察的物像不在视野中央,甚至不在视野内,可用载物台调节手轮上下左右移动标本的位置使物像进入视野并移至中央。在调焦时如果镜头与玻片标本的距离已超过了1 cm还未见到物像,应严格按上述步骤重新操作。

3. 高倍镜的使用方法

(1) 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,同时调准焦距,使被观察的物像最清晰。

(2) 转动物镜转换器,直接使高倍镜转到工作状态(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。

有些显微镜在低倍镜准焦的状态下直接转换高倍镜时会发生高倍物镜碰擦玻片而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后重新操作。如果调整后仍不能转换,则是由于高倍镜过长,此时应将载物台下降或使镜筒升高后再转换,然后在眼睛的注视下使高倍镜贴近盖玻片,边观察目镜视野边用粗调螺旋极缓慢地使载物台下降或镜筒上升,看到物像后再用细调螺旋调准焦距。

4. 油镜的使用方法

(1) 用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分移至视野中央。

(2) 将聚光器升至较高位置并将光圈开至最大(油镜所需光线较强)。

(3) 转开高倍镜,往玻片标本上需观察的部位滴一滴香柏油或石蜡油作为介质,然后在眼睛的注视下,使油镜转至工作状态,此时油镜的下端镜面一般应正好浸在油滴中或与油滴接触。也可先稍稍下降载物台或上升镜筒,使油镜对准通光孔,再使油镜下端浸入油滴中并贴近盖玻片。

(4) 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。

在观察时,如发现视野中的某标本不知是何物而需要老师或同学帮助观察确定时,可将视野中的指针(装在目镜中的头发或细铜丝)对准有疑问的标本。如果镜中未装指针,可将视野看成一个带有时间标记(如3、6、9、12)的时钟面,指出有疑问标本位于几点钟的所在位置。

(5)油镜使用完后,必须及时将镜头上的油擦拭干净。操作时先将油镜升高1 cm并将其转离通光孔,先用干擦镜纸擦拭1次,把大部分的油去掉,再用沾有少许清洁剂的擦镜纸或脱脂棉球擦1次,最后再用干擦镜纸擦1次。

至于玻片标本上的油,如果是盖玻片的永久制片,可直接用上述方法擦干净;如果是无盖玻片的标本,则载玻片上的油可用拉纸法揩擦,即先把一小张擦镜纸盖在油滴上,再往纸上滴几滴清洁剂或二甲苯,趁湿将纸往外拉,如此反复几次即可擦干净。

显微镜使用完毕后,应取下玻片,将标本放回玻片盒。再将镜头转离通光孔并将镜体擦拭干净,最后罩上塑料袋放回镜箱中。

(四)使用显微镜时应注意的事项

在使用显微镜时应注意如下几点:

(1)取用显微镜时,应轻拿轻放,较长距离移动显微镜时,应一手紧握镜臂,一手托住镜座,不要用单手提拿,以避免目镜或其他零部件滑落。

(2)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免灰尘落入镜内。

(3)显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指擦拭,以免磨损镜面,需要时只能用擦镜纸轻轻擦拭,机械部分可用纱布等擦拭。

(4)在任何时候,特别是使用高倍镜或油镜时,都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。

(5)显微镜使用完后应及时复原,用防尘罩盖好,并贮放在干燥的地方。

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6 mm之内?而油镜则先使其贴近标本片表面?
3. 如果标本片放反了,可用高倍镜或油镜找到标本吗?为什么?
4. 怎样才能准确而迅速地在高倍镜或油镜下找到目标?
5. 如何判断视野中所见到的污点是在目镜上?目镜在显微镜的成像上起什么作用?
6. 在对低倍镜进行准焦时,如果视野中出现了随标本片移动而移动的颗粒或斑纹,是否将标本移至物镜中央,就一定能找到标本的物像?
7. 使用显微镜应注意哪些事项?

实验二 特殊显微镜的结构及其使用

I 暗视场显微镜

一、实验目的

掌握暗视场显微镜的原理、构造及其使用方法。

二、实验原理

暗视场显微镜在构造上应用丁达尔现象 (Tyndall phenomenon), 装配了一类特殊聚光器——暗视场聚光器, 使入射光束从聚光器斜向照明被检物品。由于照明光线与显微镜光轴形成较大的角度通过物场或因聚光器的特殊构造, 照明光线在聚光器顶透镜 (或盖片) 的上表面发生全反射, 致使照明光线不能入射物镜之内。但是, 样品被照明并发出反射和散射光。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。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。如果是正在分裂的细胞, 其各类纺锤丝和染色体亦可窥见。

暗视场显微镜是利用样品的散射光和反射光进行观察, 所以只能看到物体的存在与运动而不能辨清其微细结构。暗视场显微镜的检测能力, 取决于入射光的强度和视场的反差, 后者又随微粒及其背景的折射率差别的加大而增加。

暗视场显微镜与普通光学显微镜的区别, 主要在于聚光器的不同, 致使照明方法有别。确切地说, 称暗视场显微镜为暗视场照明更为贴切。暗视场照明是斜向照明的一种, 这种照明法能提高对微小物体的分辨能力, 对大小在 $0.004\ \mu\text{m}$ 以上的微小粒子, 尽管看不清楚其结构, 亦可清晰地分辨其存在和运动。

三、实验器具

普通复式光学显微镜、暗视场聚光器、黑纸、剪子、圆规、直尺、铅笔、滤光片、香柏油、载玻片、盖玻片和镜检的制片样品等。

四、实验方法与步骤

普通光学显微镜只要卸下明视场聚光器, 更换规格适宜的暗视场聚光器, 就成为暗视场照明的暗视场显微镜了。

五、暗视场聚光器的种类

暗视场聚光器种类较多,各厂家都有各自通用或专用的配套产品。本实验仅重点介绍两类聚光器:抛物面聚光器和心形聚光器。

(一) 抛物面聚光器 (paraboloid condenser)

构成聚光器的两部分是聚光镜和光阑,但其又具有特殊的构造。聚光镜下通光的光阑,中央为较大的圆形的阻光的暗视场光挡,外周为一环状不可变的透光光阑。入射的照明光束呈环状。聚光镜为一抛物面体,图像为抛物面,上下为与光轴垂直的两平面(图2-1)。入射的环状照明光束,经聚光镜抛物面的反射,使光线会聚于样品处,并斜向照明样品。在聚光镜与载片间油浸,且把聚光器升至最高点时,入射光线将在盖玻片面上发生全反射,照明光线不进入物镜之内造成暗视场效果。不油浸时,入射光线的全反射将发生在聚光镜的上表面,这将影响对样品的照明。

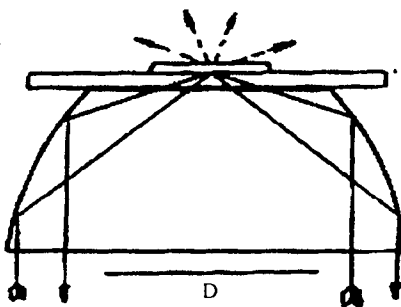


图2-1 抛物面聚光器及其光路
D:暗视场光挡,入射光发生全反射,样品被照明并射出反射光,散射光进入物镜
(引自《细胞生物学实验》杨汉民,1997)

抛物面聚光器因构造的不同入射光亦有不发生全反射的类型,因聚光镜抛物面的特殊角度,使照明光线在盖玻片表面斜向透射,不进入物镜。样品被斜射光线照明,照明光线经全反射返回聚光器或透过样品射向空间。被照明的样品发出反射光和散射光进入物镜,呈现为明亮的物体。

(二) 心形聚光器 (cardioid condenser)

聚光镜由心形回转面和球面的透镜组成,中央反射面是球面,两侧是心形面。聚光镜下方为遮光挡板,入射光线从周缘环状光阑射入,入射光线经球面和心形面透镜的反射形成一空心的照明光锥,光线经反射,会聚于聚光器上面的被检样品处(图2-2)。光线照明样品后,射向物镜之外,样品产生散射光和反射光进入物镜,结果造成暗视野的背景和明亮的被检样品其形态和运动清晰可见。

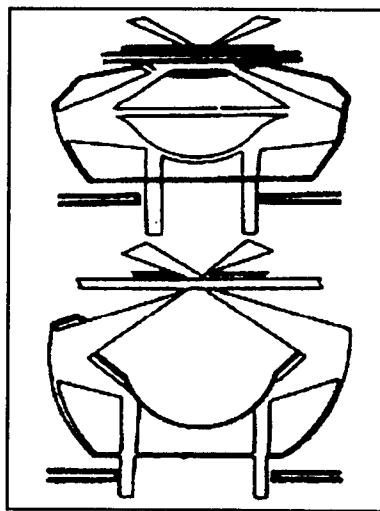


图2-2 暗视场聚光器
上:油浸暗视场聚光器,下:干燥系暗视场聚光器
(引自《细胞生物学实验》杨汉民,1997)

六、暗视场聚光器的使用方法

暗视场聚光器是显微镜暗视场照明的专用附件,其连接部分的构成或外径与普通视场聚光器相同,同一厂家的系列产品一般可通用。其使用方法如下:

(2) 把被检样品的玻片标本置于载物台上,需用油浸的暗视场聚光器,要在聚光器上透镜与载片间滴加香柏油。

(3) 聚光器光轴的调中。聚光器的光轴要与显微镜的光轴位于同一轴线上。其方法是:用低倍物镜对样品聚焦。随之用聚光器升降螺旋上下调节聚光器位置,当在暗视场中清晰地窥见一光环或圆形光点时,停止升降聚光器,用聚光器调中杆推动聚光器,使视场中的光环或光点,调至视场中心位置。

(4) 调节聚光器焦点,使之位于被检样品处,转动聚光器升降螺旋,使视场中光环调成一最小的圆形光点,此刻即为聚光器的焦点恰于样品处。

(5) 更换需用的高倍物镜进行镜检观察。

七、使用暗视场聚光器的注意事项

由于暗视场显微镜的聚光器与普通光学显微镜不同,因此在使用暗视场聚光器时应注意以下几点:

(1) 聚光器与物镜的数值孔径应合理匹配,物镜的数值孔径必须小于聚光器的数值孔径;否则会因物镜孔径角大于暗视场聚光器所形成的照明光束中心暗区的角度,致使部分照明光线射入物镜,破坏或降低了暗视场的照明。

(2) 使用高数值孔径的油浸暗视场聚光器时,在聚光器与载玻片之间要滴加香柏油进行油浸,使两者密接。否则,照明光线于聚光器的上透镜表面进行全反射,照明光线照射不到被检样品,呈现不出暗视场照明的效果。

(3) 载玻片厚度要适宜,照明光束经暗视场聚光器后,产生空心照明光锥,即中心为暗区,而反射光的焦点在聚光器上透镜表面之上很短的距离,因此,载玻片的适宜厚度应为 $0.8 \sim 1.2 \text{ mm}$ 。

(4) 载玻片和盖玻片应清洁无伤痕,否则照明光线会于其处发生漫反射而影响暗视场的照明。

(5) 照明光源的照明强度要高。因暗视场照明是通过反射光照亮被检样品,若照明强度过弱照明样品的反射光强度不够,会影响观察效果,目前多应用高功率的溴钨灯作为照明光源以提高其照明强度。

思考题

1. 为什么暗视场照明的视场暗黑,而样品影像明亮?
2. 使用暗视场照明时,为什么必须在聚光器与载玻片间进行油浸?
3. 如何进行暗视场聚光器的光轴调中和聚焦?