

全国高等院校医学实验教学规划教材

显微形态学实验教程

主 编 胡志红 许晓源



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

显微形态学实验教程

主 编 胡志红 许晓源

副主编 郑美蓉 姜玉峰 程 玲

编 者 (按姓氏汉语拼音排序)

陈雄林(九江学院基础医学院)	程 玲(九江学院基础医学院)
龚 勇(九江学院基础医学院)	胡志红(九江学院基础医学院)
黄 涛(九江学院基础医学院)	姜玉峰(石河子大学医学院)
李思源(石河子大学医学院)	刘见见(九江学院基础医学院)
裴学莲(石河子大学医学院)	汪鑫平(九江学院基础医学院)
王 庭(九江学院基础医学院)	吴红波(九江学院基础医学院)
吴 萍(九江学院基础医学院)	许晓源(九江学院基础医学院)
郑美蓉(九江学院基础医学院)	郑 涛(九江学院临床医学院)
周英妹(九江学院基础医学院)	

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

本书为人体医学显微形态学实验教材,全书共分四篇。第一篇介绍了显微镜的结构和使用及形态学常规技术等基本知识。第二篇主要是形态学经典验证性实验,包括组织学与胚胎学验证性实验、病理学验证性实验。第三篇为综合性实验,主要为病理临床病例讨论和尸检病例死因分析。第四篇为研究创新型实验,以设计性实验为主题介绍了创新研究的思路和基本程序及方法。

本教材适于医学类本、专科组织学、病理学实验教学使用,不同专业可根据该专业的课程标准和实验教学的要求选择具体的实验内容,某些章节内容可作为学生进行科研设计或实验时的参考。

图书在版编目(CIP)数据

显微形态学实验教程 / 胡志红,许晓源主编. —北京:科学出版社,2012
全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-032902-8

I. 显… II. ①胡… ②许… III. 人体形态学-显微术-实验-医学院校-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 244295 号

责任编辑:许贵强 丁海燕 / 责任校对:朱光兰

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

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>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 2 月第一次印刷 印张:16 1/2

字数:408 000

定价:59.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

组织学是研究正常机体微细结构及相关功能的科学;病理学主要研究人体疾病发生过程中器官、组织的病理改变,从而探讨疾病的发生发展规律,揭示疾病的本质。两者皆属重要的医学基础形态学科,着重从形态学的角度研究和阐述机体正常生理功能的结构基础、疾病的病理变化。两者密切相连,相互交融,只有学好组织学,认识人体的微细结构及其相关功能,才能在解剖学的基础上,从宏观到微观,全面掌握人体的形态结构,探索生命现象的物质基础;也只有认识和掌握了人体的正常结构,才能更好地分析和理解人体的生理过程和病理过程,才能学好生理学、病理学及其他医学基础课程和临床课程。

形态学课程具有内容繁杂、理论抽象、专业名词多、记忆难度大,直观性、实践性强的特点。形态观察是学习形态学课程的基本途径。因此,实验教学在教学中具有十分重要的地位,通过实验教学形态观察(肉眼观察和显微观察)来加深对理论知识的理解,认识疾病的病理变化,掌握疾病的本质。

受传统教学模式等因素制约,形态学相关学科间如病原学(微生物学与寄生虫学)和病理学之间、正常形态(解剖学与组织学)与异常病变(病理学)之间、宏观结构(解剖学)与微观形态(组织学)之间一些相关知识相互脱节,相互割裂,缺乏有效的衔接及协调配合。学生所掌握的只是支离破碎的篇章,其间缺乏有机的联系,所学知识难以融会贯通、学以致用,不能将所学基础知识有效地用于指导临床实践。影响学生发现问题、解决问题能力的培养,阻碍了教学效果的提高。

为有助于学生对前期基础课程知识的巩固、提高和综合运用,加强学科间知识的有机联系和有效衔接,根据形态学教学特点,利用本校显微数码互动形态学实验平台,按照高校实验教学基本要求和新世纪人才培养目标要求,在参考兄弟院校教材内容的基础上,我们编写了这本《显微形态学实验教程》。

本教材在编写过程中,力求内容丰富、层次分明、条理清晰、重点突出、语言精练、图文并茂、通俗易懂。在保证基本理论、基本知识、基本技能基础上,依据知识点关联度,进行多学科知识组合,将正常组织形态、异常病理形态变化以及相关疾病的病原生物学的内容及图片融为一体,以便在实验过程中正常、异常形态相互对照;纵向、横向知识相互联系;使孤立分散的知识点综合为一个体系,加深对疾病的理解,提高病变识别的准确率,降低切片观察的难度,旨在培养学生独立思考、分析问题、解决问题和综合应用能力,为后续临床课程的学习奠定一个坚实的基础,以培养医学高等实用型技术人才,适应社会需要。

本教材编写过程中得到了科学出版社和九江学院基础医学院领导的大力

支持,同时参考了部分兄弟院校的教材或实验教材,在此一并表示衷心感谢。显微形态实验学作为一门新型课程,要把所有与形态有关的实验编织在一起,实属不易,目前还有不少实验内容需要不断完善、补充,加上编者水平有限,在编写过程中难免存在缺点和错误,望广大读者在使用中不吝赐教,以便今后进一步修订、完善。我们真诚希望本教材对读者学好组织学、病理学有所帮助,并欢迎读者批评指正。

编 者
2011年8月

目 录

第一篇 常用仪器及实验方法

第一章 显微镜的结构和使用	(1)
第一节 普通光学显微镜的结构和使用	(1)
第二节 荧光显微镜的结构和使用	(3)
第三节 倒置相差显微镜的结构和使用	(4)
第四节 激光扫描共聚焦显微镜基本原理和应用	(5)
第五节 电子显微镜的基本原理及应用	(7)
第六节 数码显微互动教学系统	(9)
第二章 实验方法	(11)
第一节 组织切片制作及染色技术	(11)
第二节 组织化学与细胞化学技术	(13)
第三节 免疫组织化学技术	(15)
第四节 原位杂交技术	(16)
第五节 组织细胞培养技术	(19)

第二篇 经典验证性实验

第三章 组织学与胚胎学实验	(22)
绪论	(22)
第一节 上皮组织	(23)
第二节 固有结缔组织	(27)
第三节 软骨和骨	(32)
第四节 血液和血细胞发生	(35)
第五节 肌组织	(38)
第六节 神经组织	(42)
第七节 神经系统	(47)
第八节 皮肤	(51)
第九节 循环系统	(55)
第十节 内分泌系统	(60)
第十一节 免疫系统	(66)
第十二节 消化道	(71)
第十三节 消化腺	(76)
第十四节 呼吸系统	(80)
第十五节 泌尿系统	(84)

第十六节 男性生殖系统	(88)
第十七节 女性生殖系统	(92)
第十八节 眼和耳	(96)
第十九节 人胚早期发生	(101)
第四章 病理学实验	(109)
绪论	(109)
第一节 细胞、组织形态学特征和损伤	(113)
第二节 损伤的修复	(121)
第三节 局部血液循环障碍	(125)
第四节 炎症	(132)
第五节 肿瘤	(140)
第六节 心血管系统疾病	(148)
第七节 呼吸系统疾病	(159)
第八节 消化系统疾病	(166)
第九节 淋巴造血系统疾病	(182)
第十节 泌尿系统疾病	(186)
第十一节 生殖系统疾病	(194)
第十二节 内分泌系统疾病	(204)
第十三节 神经系统疾病	(212)
第十四节 传染病	(218)
第十五节 寄生虫病	(227)

第三篇 综合性实验

第五章 临床病理讨论	(232)
病例讨论一	(232)
病例讨论二	(233)
病例讨论三	(233)
病例讨论四	(234)
病例讨论五	(235)
病例讨论六	(235)
病例讨论七	(235)
病例讨论八	(236)
病例讨论九	(236)
病例讨论十	(237)
病例讨论十一	(237)
病例讨论十二	(238)
第六章 尸检病例分析	(239)
尸检病例一	(239)
尸检病例二	(243)

第四篇 研究创新型实验

第七章 设计性实验 (250)

 第一节 科研设计的基本要素与原则 (250)

 第二节 设计性实验基本程序 (252)

 第三节 设计性实验报告和实验研究论文的撰写 (253)

 第四节 设计性实验示例 (254)

第一篇 常用仪器及实验方法

第一章 显微镜的结构和使用

光学显微镜(又称显微镜或光镜)是人体显微形态学实验的主要仪器。了解显微镜的结构,正确熟练地使用显微镜是医学院校学生的基本实验技能之一。本章着重介绍显微镜的结构和使用方法。

第一节 普通光学显微镜的结构和使用

一、显微镜的结构

显微镜是由机械部分和光学部分两大部分组成(图 1.1.1.1)。

(一) 机械部分

有支持和调节光学部分的作用,包括:

1. 镜座 位于显微镜底部,稳定和支持显微镜。
2. 镜臂 供握持显微镜用并支持镜筒。
3. 镜筒 上接目镜,下接转换器和物镜。
4. 转换器 为 1 个转盘,其上装有 3~4 个物镜。
5. 载物台 供放标本用的平台,中心有一通光孔,台上有推进器。
6. 调焦装置 分粗调节器(多低倍镜用)和细调节器(多高倍镜用)。

(二) 光学部分

1. 目镜 位于镜筒上端,由一组透镜组成。其作用是再次放大物镜放大的实像,其放大倍率通常为 $7\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等,数字越大则放大倍数越高,常用 $10\times$ 目镜,有的内装有指针。显微镜的放大倍数 = 目镜放大倍数 $\times$ 物镜放大倍数。
2. 物镜 装于转换器上,由一组透镜组成,是对物体的图像进行第一次放大。镜头上标有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 放大倍数。
3. 光源 镜座上方的一个圆形双面镜,需弱光时用平面镜,需强光时用凹面镜。带电光源显微镜的光源常安装在镜座的底部或顶部,通常有卤素灯、钨丝灯、汞灯、荧光灯、金属卤

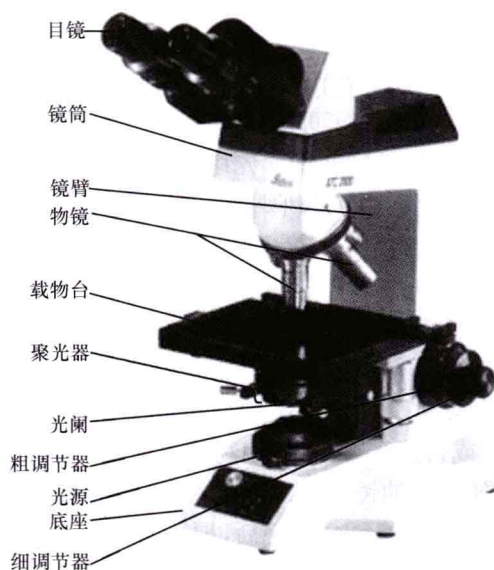


图 1.1.1.1 光学显微镜的结构

化物灯等。

4. 聚光器 由几个透镜组成,可聚光线,其下装有光阑(又称光圈),它可以集中透射过来的光束,使更多的光集中照射被观察的物体部位。推动把手可调节光圈大小。

二、显微镜的使用及注意事项

(一) 使用方法

1. 取镜 拿镜时右手握镜臂,左手托底座。切勿一手斜提,前后摆动,以防镜头或其他零件跌落。观察时置于身体左前方,以便右手绘图或记录。

2. 对光 先把低倍镜与镜筒调成一条直线,然后升高聚光器,打开光圈,再观察目镜,调节光源直到视野内光线均匀为止。如是双目显微镜,还需通过推移两目镜筒调节瞳距,当观察到两个圆形视野完全重合时,说明瞳距已调节好了。

3. 置片 将玻片置于载物台上并移到载物台孔中心,注意玻片正面(有盖玻片的一面)向上。

4. 观察

(1) 肉眼观察:主要观察玻片上标本的大小、形状及颜色,以便于镜下观察。

(2) 低倍镜观察:先用粗调节器升降载物台,使物镜距标本 0.5cm 左右,同时注意观察,直到视野中出现清晰的图像为止,再根据需要调节光线的强弱和标本的位置。低倍镜主要观察标本的基本结构。

(3) 高倍镜观察:在观察标本的细微结构时,应先将观察部位移至视中央,再换高倍镜观察,并用细调节器调节,直到获得清晰的图像为止。高倍镜下图像不清晰的原因通常可能是玻片放反了即有盖玻片的一面朝下了,或是高倍物镜没有拧紧。

5. 油镜的使用 先用低倍镜对光,光线要强,将光圈完全打开并升高聚光器,再经低倍镜、高倍镜观察找到要观察的对象,将其移至视野中央,移开高倍镜。在需观察的部位滴上一小滴香柏油(油量不能多,也不要涂开),再慢慢转动油镜使镜头浸入油中。然后用目镜观察直到出现清晰图像为止。观察完后下降载物台,移开镜头,用擦镜纸蘸二甲苯或乙醚无水乙醇混合液(7:3)擦拭镜头和玻片。

使用油镜要加香柏油的原理:油镜放大倍数高而透镜很小。自玻片透过的光线,因玻片和空气介质密度不同而折光率也不同,所以有些光线经玻片和空气折射后不能进入物镜,或折射光线很少,使物像不清晰。在油镜和标本间滴加与玻片折光率相仿的香柏油,就会使进入油镜的光线增多,视野光度增强,图像清晰。

6. 收镜 观察完后,取下玻片,将片夹摆正。将物镜“八”分开,使其下降到接近载物台,并将反光镜放平或关闭光源。

(二) 注意事项及维护保养

1. 严禁将显微镜镜头随意取下,更不准互换镜头。使用前检查各部分是否齐全,如有缺损,及时报告。

2. 保持目镜、物镜清洁,若附有灰尘,可用吹风球清洁干净,严禁用手指直接涂抹透镜。也不能用水擦拭镜片,这样残留的水渍可能滋生真菌,严重损坏显微镜。

3. 显微镜的细调节器最为精密,易磨损失灵。所以切忌在粗调节器没有找到物像前,盲目地使用细调节器。

4. 目镜筒切忌不加任何罩具的裸露在外。显微镜使用完后,应用防尘罩罩住。

(吴红波)

第二节 荧光显微镜的结构和使用

荧光显微镜(fluorescence microscope)是一种进行光学特殊波长选择性观察使用的显微镜,适用于观察一些能够产生特殊光谱的物质检测。如生物组织切片染色检测、细胞染色观察、RNA 和 DNA 的荧光表达测量等。荧光显微技术在生命科学和医学领域中被广泛应用,例如在组织、细胞观测中,可通过特殊的荧光染色来观察感兴趣的目标成分及其生长死亡状态;在免疫学中,利用免疫荧光技术可检测抗体和抗原的特异性结合;在基因组学中,利用荧光素标记特异性核酸片段,可通过杂交反应,鉴定匹配基因的存在。

一、荧光显微镜的结构

它是由光源、滤板系统和光学系统等主要部件组成。其原理是利用一个高效发光光源,经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光,激发检测样品内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后,再通过物镜和目镜进行放大观察。

荧光显微镜是由普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等)组成。荧光光源一般采用超高压汞灯(50~200W),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、蓝色和绿色激发滤片),仅使一定波长的激发光经物镜照射到标本上。当观察样本中的荧光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荧光(可见光)。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。荧光显微镜就其光路分透射式荧光显微镜和落射式荧光显微镜(图 1.1.2.1)。

二、使用方法

1. 接通电源,待光源发出强光至稳定状态。
2. 透射式荧光显微镜需在光源和聚光器之间装上所要求的激发滤片,在物镜后面装上相应的阻断滤片。落射式荧光显微镜需在光路的插槽中插入所要求的激发滤片/双色素分离器/阻断滤片的插块。
3. 将荧光指示剂标记好的样品放置在载物台上。
4. 将物镜放在光路中聚焦样本,并按需要选择 ND 滤光片。
5. 先用低倍镜观察,调节视野光阑和孔径光阑,使光源中心位置位于照明光斑的中央,整个镜下视野亮度均匀。
6. 调焦观察。

【注意事项】

1. 荧光较弱,应在暗室中进行检查。接通电源,点燃超高压汞灯,待光源发出强光稳定后,眼睛完全适应暗室,再开始观察标本。

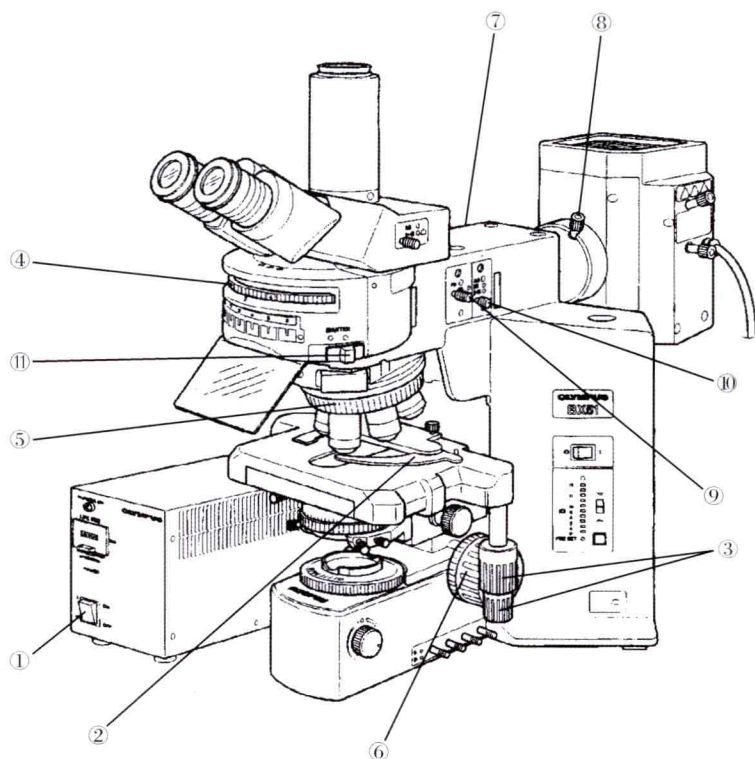


图 1.1.2.1 荧光显微镜的结构

- ①主开关;②样品夹;③X轴、Y轴旋钮;④荧光组件室;⑤物镜转换器;⑥粗调/微调旋钮;
⑦ND滤光片;⑧集光透镜聚焦钮;⑨视场光阑旋钮;⑩孔径光阑旋钮;⑪挡板旋钮

2. 未装滤光片时不要用眼直接观察,以免损伤眼睛。

3. 荧光显微镜光源寿命有限,标本应集中检查,以节省时间,保护光源。新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再用时,须待灯泡充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源。

4. 标本染色后立即观察,时间久了荧光会逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中4℃保存,可延缓荧光减弱时间,防止封裱剂蒸发。

第三节 倒置相差显微镜的结构和使用

倒置相差显微镜(inverted phase contrast microscope)是相差显微镜和倒置显微镜的结合,即具有倒置显微镜的倒置观察方式,同时,成像原理则与相差显微镜成像原理相一致。

相差显微镜的基本原理是把透过标本的可见光的相位差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。光波有振幅(亮度)、波长(颜色)及相位(指在某一时间上光的波动所能达到的位置)的不同。当光通过物体时,如波长和振幅发生变化,人们的眼睛才能观察到,这就是普通显微镜下能够观察到染色标本的道理。而活细胞和未经染色的生物标本,因细胞各部微细结构的折光性相近或对比度不够,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位有变化(相应发生的差异即相差),而这种微小的变化,人眼是无法加以鉴别的,故在普通显微镜下难以观察到。相差显微镜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,可以观察到活细胞或未染色标本。其结构特点是:①环形光阑位于光源与聚光器之间,作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥,使直射光和衍射光分离,聚焦到标本上。②物镜中加了涂有氟化镁的相位板。其作用是使直射光和衍射光发生干涉,导致相位差变成振幅差,使明暗反差加强,提高标本内各种结构的对比度,使标本结构清晰可见。③中心望远镜装置。

倒置相差显微镜常用于观察组织培养中活细胞的组织结构,它与相差显微镜基本相同,但其照明系统位于镜体上方,而物镜则位于下部。这样使物镜能聚焦到培养瓶底的活细胞,还可以对体外培养细胞进行观察、拍照录像等。如果安装了显微操作系统,则可以利用机械臂对细胞甚至染色体进行精细地操作,如核移植、基因导入、染色体显微切割等。

第四节 激光扫描共聚焦显微镜基本原理和应用

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)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,在传统光学显微镜的基础上利用共轭聚焦的原理,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。它可有效消除周围环境杂散光和物体各部分之间弥散光斑的影响,具有更高的分辨率,还可实现多重荧光同时观察和三维层析等。LSCM 主要由五部分组成:显微光学系统、扫描装置、光源、检测器和应用软件系统。各部件之间的操作切换都可在计算机操作界面中进行。

一、主要应用

1. 细胞的三维重建 普通荧光显微镜分辨率低,显示的图像结构不够清晰。LSCM 能以 $0.1\mu\text{m}$ 的步距进行分层扫描,得到的光学切片经转换后作为二维数据贮存。这些数组通过计算机进行不同的三维重建算法,可做单色或双色图像处理,组合成细胞真实的三维结构。旋转不同角度可观察各侧面的表面形态,也可从不同的断面观察细胞内部结构,测量细胞的长宽高、体积和断层面积等形态学参数。通过模拟荧光处理算法,可以产生在不同照明角度形成的阴影效果,突出立体感。LSCM 的三维重建广泛用于各类细胞骨架和形态学分析、染色体分析、细胞程序化死亡的观察、细胞内细胞质和细胞器的结构变化的分析和探测等方面。

2. 组织光学切片 LSCM 利用照明点与探测点的共振获得高分辨率,同时具有深度识别力和纵向分辨率,以一个微量步进马达控制载物台的升降,逐层获得高反差、高分辨率、高灵敏度的二维图像。从而对观察对象进行无损伤的系列光学切片,获得各层面信息。这种功能又称显微 CT。

3. 组织和细胞中荧光标记的分子和结构的检测 标本制备方法主要有免疫荧光组织和细胞化学法、荧光蛋白标记分子法、荧光细胞染料标记法等。与传统的荧光显微镜相比,除了有较高的分辨率以外,一个主要的不同是 LSCM 可以利用激光点扫描成像,形成光学切片,进而可以利用沿纵轴上移动标本进行多个光学切片的叠加形成组织或细胞中荧光标记结构的总体图像,可以用于观察切片和一些表面不平的标本,特别是研究具有长突起的

神经元时更有使用价值。同时可以做三维图像重建和标志强度的半定量分析。

4. Ca^{2+} 、pH 及其他细胞内离子浓度的实时定量测定 利用 Fluo-3、Indo-1 等荧光探针可以对细胞内 Ca^{2+} 等离子、pH 的比例及动态变化做微秒级和毫秒级的实时定量分析,完成活细胞生理信号的动态监测。

5. 荧光漂白及恢复(FRAR)技术 利用高强度脉冲式激光束将细胞内某一区域中选定的某种荧光淬灭,然后观察邻近相同的荧光标记物重新扩散入该区域的速度和方式,从而分析细胞内蛋白质运输、受体在细胞膜上的流动和大分子组装等细胞生物学过程,可用于细胞骨架构成、核膜结构和大分子组装等。

6. 长时程观察细胞迁移和生长 目前 LSCM 的软件一般可自动地进行定时和定方式的激光扫描,由于新一代 LSCM 的探测效率的提高,只需要很小的激光能量就可以达到较好的图像质量,从而减小每次扫描时激光束对细胞的损伤,因此,可用数小时的长时程定时扫描,记录细胞迁移和生长等细胞生物学现象。

二、使用及注意事项

1. 观察步骤及仪器操作 根据实验要求制备样品完毕后,即可进行观察,基本步骤如下。

(1) 开启仪器电源及光源:首先开启显微镜和激光器,再启动计算机,然后启动操作软件,设置荧光样品的激发光波长,选择相应的滤光镜组块。

(2) 设置相应的扫描方式:在目视模式下调整所用物镜放大倍数,在荧光显微镜下找到需要检测的细胞。切换到扫描模式,调整双孔针和激光强度参数,即可得到清晰的共聚焦图像。

(3) 获取图像:选择合适的图像分辨率,将样品完整扫描后,保存图像结果即可。

(4) 关闭仪器:仪器测定样品结束后,先关闭激光器部分,计算机仍可继续进行图像和数据处理。若要退出整个激光扫描共聚焦显微镜系统,则应该在激光器关闭后,待其冷却至少 10 分钟后再关闭计算机及总开关。

2. 获取三维图像 激光扫描共聚焦显微镜具有细胞 CT 功能,它可以在不损伤细胞的情况下,获得一系列光学切片图像。选用 Z-Stack 模式,即可实现此项功能。

3. 获取时间序列图像 共聚焦显微镜的 Time-Series 功能,可自动在实验人员规定的时间内按照设定的时间间隔获取图像。只需设定所需的时间间隔以及所需图像数量,开启 Start T 功能键,即可进行实验。Time-Series 功能大大减轻了实验人员的劳动强度,对于荧光漂白恢复和钙离子成像等实验非常实用。

4. 注意事项及维护保养

(1) 仪器周围要远离电磁辐射源;

(2) 汞灯开关的时间不能间隔太短;

(3) 室内具有遮光系统,保证荧光样品不会被外源光漂白;

(4) 激光管使用前要预热,不能反复开关;

(5) 控制工作温度在 $5\sim 25^{\circ}\text{C}$ 。

(吴红波)

第五节 电子显微镜的基本原理及应用

电子显微镜按结构和用途可分为透射式电子显微镜、扫描式电子显微镜两大类。透射式电子显微镜常用于观察那些用普通显微镜所不能分辨的细微物质结构;扫描式电子显微镜主要用于观察固体表面的形貌,也能与 X 射线衍射仪或电子能谱仪相结合,构成电子微探针,用于物质成分分析;发射式电子显微镜用于自发射电子表面的研究。

一、透射电子显微镜

电镜的基本组成包括电子枪(光源)与加速级管、聚光系统、成像系统、放大系统和记录系统。光路上主要由各种磁透镜和光阑组成。

(一) 照明系统

该系统分成两部分:电子枪和会聚镜。电子枪由灯丝(阴极)、栅级和阳极组成,加热灯丝发射电子束,在阳极加电压,电子加速,阳极与阴极间的电位差为总的加速电压,经加速而具有能量的电子从阳极板的孔中射出。射出的电子束能量与加速电压有关,栅极起控制电子束形状的作用。电子束有一定的发散角,经会聚镜调节后,可望得到发散角很小甚至为 0 的平行电子束。电子束的电流密度(束流)可通过调节会聚镜的电流来调节。

(二) 成像放大系统

该系统包括样品室、物镜、中间镜、反差光栏、衍射光栏、投射镜以及其他电子光学部件。样品室有一套机构,保证样品经常更换时不破坏主体的真空。样品可在 X、Y 二方向移动,以便找到所要观察的位置。经过会聚镜得到的平行电子束照射到样品上,穿过样品后就带有反映样品特征的信息,经物镜和反差光阑作用形成一次电子图像,再经中间镜和投射镜放大一次后,在荧光屏上得到最后的电子图像。

(三) 观察照相室

电子图像反映在荧光屏上。荧光发光和电子束流成正比。把荧光屏换成电子干板,即可照相。干板的感光能力与其波长有关。

(四) 真空系统

真空系统由机械泵、油扩散泵、离子泵、真空测量仪表及真空管道组成。它的作用是排出镜筒内气体,使镜筒真空度至少要在 10^{-5} 托(1 托 $\approx 133\text{Pa}$)以上,目前最好的真空度可以达到 $10^{-9}\sim 10^{-10}$ 托。如果真空度低的话,电子与气体分子之间的碰撞引起散射而影响衬度,还会使电子栅极与阳极间高压电离导致极间放电,残余的气体还会腐蚀灯丝,污染样品。

(五) 供电控制系统

加速电压和透镜磁电流不稳定将会产生严重的色差及降低电镜的分辨本领,所以加速电压和透镜电流的稳定度是衡量电镜性能好坏的一个重要标准。透射电镜的电路主要由以下部分组成,高压直流电源、透镜励磁电源、偏转器线圈电源、电子枪灯丝加热电源,以及真空系统控制电路、真空泵电源、照相驱动装置及自动曝光电路等。

二、扫描电子显微镜

和光学显微镜及透射电镜相比,扫描电镜具有以下特点:

1. 能够直接观察样品表面的结构,样品的尺寸可大至 $120\text{mm} \times 80\text{mm} \times 50\text{mm}$ 。
2. 样品制备过程简单,不用切成薄片。
3. 样品可以在样品室中做三维空间的平移和旋转,因此可以从各种角度对样品进行观察。
4. 景深大,图像富有立体感。扫描电镜的景深较光学显微镜大几百倍,比透射电镜大几十倍。
5. 图像的放大范围广,分辨率也比较高,可放大十几倍到几十万倍,基本上包括了从放大镜、光学显微镜直到透射电镜的放大范围。分辨率介于光学显微镜与透射电镜之间,可达 3nm 。
6. 电子束对样品的损伤与污染程度较小。
7. 在观察形貌的同时,还可利用从样品发出的其他信号做微区成分分析。

三、扫描电镜的结构和工作原理

1. 结构

(1) 镜筒:镜筒包括电子枪、聚光镜、物镜及扫描系统。其作用是产生很细的电子束(直径约几个纳米),并且使该电子束在样品表面扫描,同时激发出各种信号。

(2) 电子信号的收集与处理系统:在样品室中,扫描电子束与样品发生相互作用后产生多种信号,其中包括二次电子、背散射电子、X射线、吸收电子、俄歇(Auger)电子等。在上述信号中,最主要的是二次电子,它是被入射电子所激发出来的样品原子中的外层电子,产生于样品表面以下几至几十纳米的区域,其产生率主要取决于样品的形貌和成分。通常所说的扫描电镜像指的就是二次电子像,它是研究样品表面形貌的最有用的电子信号。检测二次电子的检测器探头是一个闪烁体,当电子打到闪烁体上时,闪烁体就在其中产生光,这种光被光导管传送到光电倍增管,光信号即被转变成电流信号,再经前置放大及视频放大,电流信号转变成电压信号,最后被送到显像管的栅极。

(3) 电子信号的显示与记录系统:扫描电镜的图像显示在阴极射线管(显像管)上,并由照相机拍照记录。显像管有两个,一个用来观察,分辨率较低,是长余辉的管子;另一个用来照相记录,分辨率较高,是短余辉的管子。

(4) 真空系统及电源系统:扫描电镜的真空系统由机械泵与油扩散泵组成,其作用是使镜筒内达到 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ 托真空度。电源系统供给各部件所需的特定的电源。

2. 工作原理 从电子枪阴极发出的直径 $20 \sim 30\text{nm}$ 的电子束,受到阴阳极之间加速电压的作用,射向镜筒,经过聚光镜及物镜的会聚作用,缩小成直径约几纳米的电子探针。在物镜上部的扫描线圈的作用下,电子探针在样品表面作光栅状扫描并且激发出多种电子信号。这些电子信号被相应的检测器检测,经过放大、转换,变成电压信号,最后被送到显像管的栅极上并且调制显像管的亮度。显像管中的电子束在荧光屏上也做光栅状扫描,并且这种扫描运动与样品表面的电子束的扫描运动严格同步,这样即获得衬度与所接收信号强度相对应的扫描电子像,这种图像反映了样品表面的形貌特征。大多数生物样品都含有水分,而且比较柔软,因此,在进行扫描电镜观察前,要对样品作相应的处理。扫描电镜样品制备的主要要求是:尽可能使样品的表面结构保存好,没有变形和污染,样品干燥并且有良好的导电性能。

电镜是大型精密仪器,由专职的技术人员负责操作和维护。不同型号的电镜其操作程序不尽相同,要严格按操作程序进行操作。

四、电子显微镜的操作步骤

以 H-7500 透镜基本操作步骤为例:

1. 启动 启动稳压电源,接通冷却循环水。启动真空泵抽真空。
2. 加速电压的应用 真空度达到要求后打开高压获得照明。
3. 图像观察前的调整 由专业技术人员进行照明系统、电压中心及物镜像散的校正调整操作。
4. 样品更换 抽出侧插式样品,将覆有超薄切片的铜网安放在样品杆上并送入样品室。
5. 图像观察 利用样品移动装置选择观察视场调节中间镜电流,控制放大倍数,调节第二聚光镜,选择合适的亮度。先在低倍下调节亮度,聚焦需观察的标本,再选择适宜的观察区域放大观察。
6. 照相 将需要的结构图像照相记录。
7. 更换底片和底片预抽。
8. 关机 电镜使用完毕后,先用钥匙关掉机器,再关闭冷却水和总电源。

(郑 涛)

第六节 数码显微互动教学系统

数码互动显微教学系统是传统显微镜技术和 IT 技术、数码摄像及图像处理技术相结合的产物,弥补了传统显微镜功能上的局限,集影像、声音、文字、动画及灵活的互动系统为一体,形成了以师生互动、图像共享的教学新模式,极大地促进了形态学实验教学质量的提高(图 1.1.6.1)。其主要特点是:(1)学生镜下的图像可同时显示在学生机和教师机上,并可以请求教师帮助、与教师对话,探讨问题等。(2)学生可对镜下图像进行处理并保存,还可调出电脑中存储的图片进行复习。(3)学生可对自己显微镜下观察的图像进行显微测量、定量分析,并提交实验作业等。(4)教师可实时看到学生电脑上的图像,及时发现问题,提出问题,指导学生改正问题,并可将某一同学镜下的典型图像展示给其他同学,资源共享。(5)教师可对学生上传的作业进行批改,评分和存档,大大提高了批改作业的效率;还可通过制作包含图像、图片的考试文件对学生进行考核。



图 1.1.6.1 数码显微互动教室

一、数码显微互动教学系统的组成

1. 组成 教师端主要包括:一台数码显微镜、计算机、投影仪、投影屏、摄像头、耳麦。学生端主要包括:一台数码显微镜、计算机、摄像头、耳麦。
2. 数码显微互动教学系统的主要功能 可进行教师演示、学生示范、屏幕监视、遥控辅