

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学显微形态学实验

郭 敏 高志安 主编



科学出版社

宁夏医科大学医学影像学系教材

医学显微形态学实验

陈 惠 高 建 文 主编

宁夏医科大学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学显微形态学实验

主 编 郭 敏 高志安

副主编 刘 霞 李晓明 杨春雨 李尘远 苏荣健

编 委 (按姓氏笔画排序)

王旭光(沈阳医学院)

田 娟(辽宁医学院)

刘 霞(辽宁医学院)

杜晓媛(辽宁医学院)

杨春雨(辽宁医学院)

杨 静(辽宁医学院)

李尘远(辽宁医学院)

苏荣健(辽宁医学院)

李晓明(辽宁医学院)

李 虹(辽宁医学院)

张 勇(沈阳医学院)

宋小峰(辽宁医学院)

张 萍(辽宁医学院)

张 莉(辽宁医学院)

侯 威(辽宁医学院)

陈学军(辽宁医学院)

郭 敏(辽宁医学院)

高志安(辽宁医学院)

薛占瑞(辽宁医学院)

韩丽华(沈阳医学院)

魏国华(辽宁医学院)

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

本教材涵盖了人体形态学(除解剖学外)、细胞生物学及医学遗传学的实验教学内容,以微形态学内容为主,辅以必要的免疫组织化学及分子生物学内容,是医学生必修课程之一。本教材共分四篇:第一篇主要介绍了常用的实验仪器及其使用方法,以及形态学的基本实验方法;第二篇为经典验证性实验,是本教材的主体;此外增加了第三篇的综合性实验和第四篇的创新性实验。综合性实验融合了基础和临床多学科的实验方法,目的在于改变传统的单一实验教学模式,有利于提高学生的综合思维 and 实践能力;第四篇通过介绍一些前沿的实验方法和研究思路,旨在培养学生创新意识和能力。

本教材适用范围为高等医药院校医学专业的本、专科学生。

图书在版编目(CIP)数据

医学显微形态学实验 / 郭敏,高志安主编. —北京:科学出版社,2011

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-031974-6

I. 医… II. ①郭… ②高… III. 人体形态学-显微术-实验-高等院校-教材 IV. R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 157002 号

责任编辑:周万灏 / 责任校对:陈玉凤

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>

天时彩色印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011 年 8 月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:1 5 000 字数:420 000

定价: 54.80 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》 总编委会

- 主任 刘学政
- 副主任 曲 巍 孙洞箫 肖建英 罗俊生 梁宇恒
贾云宏
- 委员 (按姓氏笔画排序)
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 万义增 | 王 冰 | 王万旗 | 王云飞 | 王亚平 |
| 王爱梅 | 艾 浩 | 朱 艳 | 刘 丹 | 刘卫党 |
| 严宁生 | 李 红 | 李尘远 | 李华侃 | 李德华 |
| 肖 马 | 吴学敏 | 谷京城 | 闵连秋 | 张 佩 |
| 张 辉 | 张春阳 | 张祥林 | 张筠莉 | 张蕴莉 |
| 金 英 | 郝春艳 | 高志安 | 郭 敏 | 陶贵周 |
| 谢志明 | 穆殿超 | | | |
- 总策划 曲 巍
- 秘 书 崔洪雨

总 序

随着生命科学及其实验技术的飞速发展,我国高等医学教育对医学实验教学提出了更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,这对培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才具有重要意义。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,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本系列教材的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学本质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两大特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共九本,包括《大学计算机基础实践教程》、《医学大体形态学实验》、《医学显微形态学实验》、《医学机能实验学》、《生物化学与分子生物学实验》、《医学免疫学与病原生物学实验》、《医用物理学实验》、《医用化学实验》和《临床技能学》。

本系列教材读者对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、口腔、影像、麻醉、检验、护理、药学等专业需求,涵盖医学生基础医学全部的实验教学内容。

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

总编委会

2011 年 1 月

前 言

随着生命科学技术的不断发展,医学领域发生了深刻的变革,对医学教育的发展起到了积极作用,对高等医学教育中医学实验教学提出了更高的要求,新时期医学人才的培养总体目标应该是基础知识扎实,实践能力强,同时具有一定的创新能力医学人才。培养学生科学的学习态度,严谨的科学作风和勇于探索的创新精神是医学实验教学的宗旨。因此,很多医学教育工作者在积极探索和实践实验教学体系的改革,并已经取得了一定的经验。实验教学体系的改革已成为必然。努力打造以能力培养为主线的新的实验教学体系,探索把实验教学作为一门医学课程,而不单单是理论教学的辅助手段的可行性。为适应这种新的趋势和要求,我们编写了这套实验教材。

本教材体现了继承和发展理念,即继承了传统的实验教学内容,又在此基础上有所拓展,把经典的验证性实验作为教材的主体,理由是这些经典的实验是前辈们经过多年探索和实践,经过提炼而创建的实验教学体系,是实验教学的精髓,必须得到传承。同时增加部分现代的、前沿的实验方法和研究手段,体现了现代科学的研究成果。这部分内容可以依据条件在教学中选择性地应用,有一些可以通过学生自学,从而开阔学生的眼界,增强学生科学研究的思路,从而达到培养学生创新性思维的目的。

本教材整合了细胞生物学、医学遗传学、组织胚胎学和病理学的实验教学内容,组织这4个学科的部分骨干教师,认真研究教材编写思路,精心筛选了实验内容,他们都是多年来活跃在教学一线优秀骨干教师,具有较为丰富的教学经验,相信这套教材的出版会给我们的形态学实验教学带来一定的改变,经过一定时间的实践和探索,总结出适合现代医学教育的形态学实验教学体系。

尽管经过了精心准备,但由于时间和编者水平的限制,加之经验不足,本教材的编写中难免存在疏漏和不足之处,衷心希望在本教材的应用过程中,广大教师和学生能够提出意见和建议,通过不断总结和完善,使实验教学真正适应现代医学教育的需要。

郭 敏 高志安
2011年7月1日

目 录

总序
前言

第一篇 常用仪器及其使用方法

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方法	(1)
第二节 荧光显微镜的结构和使用	(6)
第三节 倒置相差显微镜的结构和使用	(9)
第四节 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理和应用	(10)
第五节 电子显微镜的基本原理和应用	(11)
第六节 数码显微互动教学系统的使用与数码显微摄像	(13)
第二章 基本实验方法	(14)
第一节 病理标本取材	(14)
第二节 组织切片制作与HE染色	(16)
第三节 组织化学与细胞化学技术	(20)
第四节 免疫组织化学技术	(24)
第五节 原位杂交技术及其应用	(31)
第六节 组织细胞培养技术	(34)
第七节 常用电镜技术及标本制备	(35)

第二篇 经典验证性实验

第一部分 细胞生物学

第一章 动物细胞的基本形态观察	(41)
第二章 细胞组分的化学反应	(45)
第三章 线粒体和液泡系的活体染色	(48)
第四章 细胞膜通透性的观察	(51)
第五章 细胞计数	(53)
第六章 细胞超微结构电镜照片的识别和细胞器的显微观察	(55)
第七章 细胞分裂	(58)

第八章 细胞融合	(60)
第九章 微丝的染色及形态观察	(62)

第二部分 组织胚胎学

第一章 上皮组织	(64)
第二章 结缔组织	(68)
第三章 软骨组织和骨组织	(71)
第四章 血液	(75)
第五章 肌组织	(78)
第六章 神经组织	(80)
第七章 循环系统	(84)
第八章 免疫系统	(87)
第九章 内分泌系统	(90)
第十章 消化管	(93)
第十一章 消化腺	(97)
第十二章 呼吸系统	(100)
第十三章 泌尿系统	(102)
第十四章 生殖系统	(105)
第十五章 中枢、皮肤、感觉器官	(109)
第十六章 胚胎总论	(115)
第十七章 颜面的发生	(120)
第十八章 消化系统和呼吸系统的发生	(122)
第十九章 泌尿系统和生殖系统的发生	(124)
第二十章 循环系统的发生	(127)

第三部分 病理学

第一章 适应、损伤和修复	(131)
第二章 局部血液循环障碍	(136)
第三章 炎症	(139)
第四章 肿瘤	(142)
第五章 心血管系统疾病	(150)
第六章 呼吸系统疾病	(157)
第七章 消化系统疾病	(163)
第八章 淋巴造血系统疾病	(171)
第九章 泌尿系统疾病	(173)

第十章 生殖系统和乳腺疾病 …… (180)	第二节 肾脏血管分布特点与肾缺血性梗死 …… (228)
第十一章 内分泌系统疾病 …… (189)	第三节 小鼠胚胎标本的制作 …… (229)
第十二章 神经系统疾病 …… (194)	第三章 疾病分析与诊断 …… (231)
第十三章 传染病 …… (198)	第一节 诊断病理学概要 …… (231)
第十四章 寄生虫病 …… (204)	第二节 病例分析与诊断 …… (239)
第四部分 医学遗传学	
第一章 人类外周血淋巴细胞染色体标本的制备 …… (207)	
第二章 人类染色体常规核型分析 …… (211)	
第三章 人类染色体 G 显带标本的制备与分析 …… (213)	
第四章 人类 ABO 血型检测 …… (217)	
第五章 人类苯硫脲(PTC)尝味实验 …… (219)	
第三篇 综合性实验	
第一章 形态学定量分析 …… (221)	
第一节 正常与肿瘤组织细胞的显微图像分析 …… (221)	
第二节 肿瘤微血管构筑异质性与正常组织微血管形态观察 …… (222)	
第三节 鼠肾发育的体视学分析 …… (224)	
第二章 动物实验 …… (228)	
第一节 血液循环与空气栓塞 …… (228)	
	第四篇 创新性实验
	第一章 组织损伤与修复 …… (245)
	第一节 肿瘤细胞凋亡的检测设计 …… (245)
	第二节 局部因素对皮肤创伤愈合的影响 …… (247)
	第二章 肿瘤的生物行为分析 …… (249)
	第一节 肿瘤的侵袭及转移能力分析 …… (249)
	第二节 肿瘤的生长与凋亡分析 …… (254)
	第三章 基因与遗传 …… (262)
	第一节 人类性状的家系收集和遗传分析 …… (262)
	第二节 疾病家系收集和遗传分析 …… (263)
	第三节 遗传咨询 …… (264)
	第四节 DNA 损伤与遗传性疾病 …… (265)

第一篇 常用仪器及其使用方法

本篇主要介绍人体形态学实验的常用仪器和使用方法,包括多种显微镜的结构和使用,光镜和电镜的常用制片方法,组织化学、免疫组织化学和原位杂交技术及组织细胞培养技术等。

第一章 显微镜的结构和使用

显微镜是一种精密的光学仪器,已有300多年的发展史。自从有了显微镜,人们看到了过去看不到的许多微小生物和构成生物的基本单元——细胞。目前,不仅有能放大千余倍的光学显微镜,而且有放大几十万倍的电子显微镜。本章主要介绍医学常用显微镜的基本结构和使用方法。

第一节 普通光学显微镜的结构和使用方法

【实验目的】

掌握普通光学显微镜的低倍镜、高倍镜和油镜使用方法;了解普通光学显微镜的基本结构及其保护要点。

【实验原理】

普通光学显微镜是一种精密的光学仪器,是生物医学研究不可缺少的工具。显微镜的镜头由一套透镜组成,普通光学显微镜通常能将物体放大1500~2000倍。显微镜的放大效能(分辨率)是由所用光波长和物镜的数值孔径决定的,缩短使用的光波波长或增加数值孔径可以提高分辨率。显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积,而物镜的放大倍数越高,分辨率越高。

【实验方法】

一、普通光学显微镜的结构

显微镜由机械装置和光学系统两大部分组成(图1-1-1-1)。

(一) 显微镜的机械装置

显微镜的机械装置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组成。

1. 镜座和镜臂 镜座的作用是支撑整个显微镜,装有反光镜,有的还装有照明光源。镜臂的作用是支撑镜筒和载物台,分固定式和活动式两种。

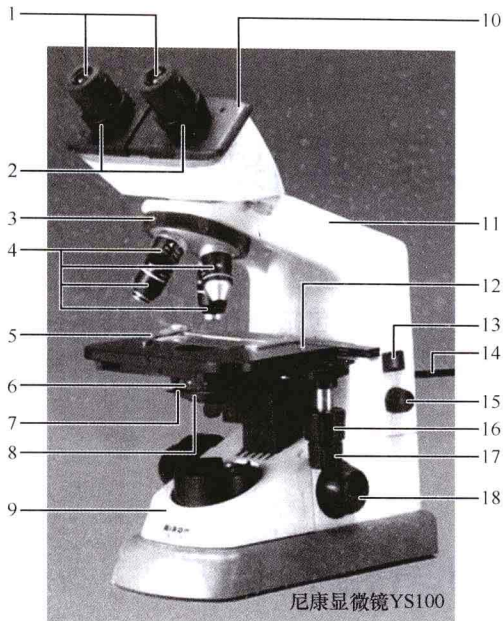


图 1-1-1-1 光学显微镜的结构

1. 目镜;2. 视力调节;3. 物镜转换器;4. 物镜;5. 片夹;6. 聚光器;7. 光栅;8. 滤光片;9. 镜座;10. 眼距调节;11. 镜臂;12. 载物台;13. 开关;14. 电线;15. 灯光调节;16、17. 推进尺;18. 调焦装置

2. 载物台(又称工作台、镜台) 载物台作用是安放载玻片,形状有圆形和方形两种。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。

3. 镜筒 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)不能变更的叫做固定式镜筒,能变更的叫做调节式镜筒,新式显微镜大多采用固定式镜筒。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。

4. 物镜转换器 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,不要用手推动物镜,因时间长容易使光轴歪斜,使成像质量变差。

5. 调焦装置 显微镜上装有粗准焦螺旋和细准焦螺旋。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。

(二) 显微镜的光学系统

显微镜的光学系统主要包括物镜、目镜、反光镜和聚光器四个部件。广义地说也包括照明光源、滤光器、盖玻片和载玻片等。

1. 物镜 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,故叫做物镜或接物镜。

(1) 物镜的分类: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)、高倍物镜(40~65 倍)。根据像差矫正情况,分为消色差物镜(常用,能矫正光谱中两种色光的色差的物镜)和复色差物镜(能矫正光谱中三种色光的色差的物镜)。

(2) 物镜的主要参数:物镜主要参数包括:放大倍数、数值孔径和工作距离。①放大倍数是指眼睛看到影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×,指的是长度是 1 μ m 的标本,放大后像的长度是 100 μ m,要

是以面积计算,则放大了 10,000 倍。显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。②数值孔径也叫镜口率,简写 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 0.05~0.95,油浸物镜(香柏油)的数值孔径为 1.25。③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。

(3) 物镜的作用是将标本作第一次放大,它是决定显微镜性能的最重要的部件。显微镜不能无限放大图像,过分放大会导致图像不清晰,它受分辨率(resolution power)的限制。分辨率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,即表示它的分辨率越高,也就是表示它的性能越好。显微镜的分辨率的大小由物镜的分辨率来决定的,而物镜的分辨率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 $R=0.61\lambda/NA$ 。公式中,R: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 400~700nm,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 μm 。

2. 目镜

(1) 目镜的结构:通常目镜由上下两组透镜组成,上面的透镜叫做接目透镜,下面的透镜叫做会聚透镜或场镜。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,用来指示某个特定的目标。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)。

(2) 目镜的作用:是将已被物镜放大的,分辨清晰的影像进一步放大,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。

(3) 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,但由于这两个物点影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。

3. 聚光器 聚光器也叫集光器。位于标本下方的聚光器支架上。它主要由聚光镜和可变光阑组成。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。

(1) 光镜的主要参数: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是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。

(2) 聚光镜的作用: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。一般地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。

(3) 可变光阑:可变光阑也叫光圈,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。

4. 反光镜 反光镜是一个可以随意转动的双面镜,直径为 50mm,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。反光镜的作用是使由光源发出的光线或天然光射向聚光器。当用聚光器时一般用平面镜,不用时用凹面镜;当光线强时用平面镜,弱时用凹面镜。观察完毕后,应将反光镜垂直放置。

5. 照明光源 显微镜的照明可以用天然光源或人工光源。

(1) 天然光源:光线来自天空,最好是由白云反射来的。

(2) 人工光源:对人工光源的基本要求:有足够的发光强度;光源发热不能过多。常用的人工光源:显微镜灯、日光灯。

6. 滤光器 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,即为了改变光线的光谱成分或削弱光的强度。分为两大类:滤光片和液体滤光器。

7. 盖玻片和载玻片 盖玻片和载玻片的表面应相当平坦,无气泡,无划痕。最好选用无色、透明度好的,使用前应洗净。盖玻片的标准厚度是 $0.17 \pm 0.02\text{mm}$,如不用盖玻片或盖玻片厚度不合适,都会影响成像质量。载玻片的标准厚度是 $1.1 \pm 0.04\text{mm}$,一般可用范围是 $1 \sim 1.2\text{mm}$,若太厚会影响聚光器效能,太薄则容易破裂。

二、显微镜的使用

显微镜观察标本切片的基本程序依次是显微镜的准备、标本的肉眼观察、低倍镜、高倍镜和油镜观察。这样才能有效、快速完成实验。

1. 显微镜的准备

(1) 取镜和放置:显微镜平时存放在柜或箱中,用时从柜中取出,右手紧握镜臂,左手托住镜座,将显微镜放在自己左肩前方的实验台上,镜座后端距桌边 $5 \sim 10\text{cm}$ 为宜,便于坐着操作。右侧放记录本或绘图纸。

(2) 对光:用拇指和中指移动旋转器(切忌手持物镜移动),使低倍镜对准镜台的通光孔(当转动听到碰叩声时,说明物镜光轴已对准镜筒中心)。打开光圈,上升集光器,并将反光镜转向光源(电光源不用),直到视野内的光线均匀明亮为止。

2. 标本的肉眼观察 主要观察切片标本的大小、外形、在切片上的位置以及大标本上主要观察的部位,以便于镜下观察。

3. 低倍镜观察

(1) 放置玻片标本:取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。

(2) 调节焦距:以左手按逆时针方向转动粗调节器,使物镜距标本片约 5mm 处。一定要从侧面观察以免造成镜头或标本片的损坏。

单筒显微镜:两眼同时睁开,用左眼在目镜上观察,左手顺时针方向缓慢转动粗调节器,直到视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心(注意移动玻片的方向与视野物像移动的方向是相反的)。如果视野内的亮度不合适,可

通过升降集光器的位置或开闭光圈的大小来调节,如果在调节焦距时,未见到物像,说明此次操作失败,则应重新操作,切不可心急而盲目地调整。

双筒显微镜:先调两个目镜筒之间的距离(瞳距),双眼看到一个明亮的圆形视野即可。调焦时,先闭左眼,转动调焦轮调节右眼至焦距清楚;闭右眼,转动左目镜的镜头至焦距清楚,此时,双眼的焦距就一致了。

4. 高倍镜观察 在低倍镜观察的基础上直接转换高倍镜到通光孔,除个别维修配置的物镜外,一般高倍镜不会碰到切片。如果进一步使用高倍物镜观察,应在转换高倍物镜之前,把物像中需要放大观察的部分移至视野中央(将低倍物镜转换成高倍物镜观察时,视野中的物像范围缩小了很多)。低倍物镜和高倍物镜基本齐焦(同高调焦),在用低倍物镜观察清晰时,换高倍物镜应可以见到物像,但物像不一定很清晰,可以转动细准焦螺旋进行调节。

5. 油镜的使用 使用油镜之前,必须先经过低倍镜、高倍镜观察,将需要观察的部分移至视野的中心,并调好焦距。因油镜需要光线较强,要将聚光器升至最高位置,光圈开到最大。转动转换器,移动高倍镜,在需观察部位滴加一滴香柏油,然后慢慢转动油镜到通光孔,使油镜浸入油中。眼睛观察目镜,并慢慢转动细调焦轮至物像清晰。如果不出现物像或目标不理想要重找,要擦去切片上的油,重复上述操作,直至满意。

使用油镜时,观察完毕后,要及时进行清洁工作。擦拭要细心,动作要轻。油浸物镜前端先用干的擦镜纸擦一两次,把大部分油去掉,再用二甲苯滴湿的擦镜纸擦两次,最后再用干的擦镜纸擦一次。标本片上的香柏油可用“拉纸法”(即把一小张擦镜纸盖在香柏油上,然后在纸上滴一些二甲苯,趁湿把纸往外拉,这样连续三四次,即可干净,一般不会损坏未加盖玻片的涂片标本)擦净。擦镜纸也要防尘,一般在使用前,将每页剪成8小块,储存在一个干净的小培养皿中,用起来既节省又方便。

三、注意事项及仪器保养

(一) 注意事项

(1) 持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方。

(2) 轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。

(3) 保持显微镜的清洁,光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭,切忌口吹、手抹或用布擦,机械部分用布擦拭。

(4) 水滴、酒精或其他药品切勿接触镜头和镜台,如果沾污应立即擦净。

(5) 放置玻片标本时要对准通光孔中央,且不能反放玻片,防止压坏玻片或碰坏物镜。

(6) 要养成两眼同时睁开的习惯,以左眼观察视野,右眼用以绘图。

(7) 不要随意取下目镜,以防止尘土落入物镜,也不要任意拆卸各种零件,以防损坏。

(8) 使用完毕后,必须复原才能放回镜箱内,其步骤是:取下标本片,转动旋转器使镜头离开通光孔,平放反光镜,下降集光器(但不要接触反光镜)、关闭光圈,推片器回位,盖上绸布和外罩,放回实验台柜内。最后填写使用登记表。

(二) 仪器保养

1. 经常性的维护

(1) 防潮:如果室内潮湿,光学镜片就容易生霉、生雾。镜片一旦生霉,很难除去。显微镜内部的镜片由于不便擦拭,潮湿对其危害性更大。机械零件受潮后,容易生锈。为了防潮,存放显微镜时,除了选择干燥的房间外,存放地点也应离墙、离地、远离湿源。显微镜箱

内应放置 1~2 袋硅胶作为干燥剂。并经常对硅胶进行烘烤。

(2) 防尘:光学元件表面落入灰尘,不仅影响光线通过,而且经光学系统放大后,会生成很大的污斑,影响观察。灰尘、砂粒落入机械部分,还会增加磨损,引起运动受阻,危害同样很大。因此,必须经常保持显微镜的清洁。

(3) 防腐蚀:显微镜不能和具有腐蚀性的化学试剂放在一起。如硫酸、盐酸、强碱等。

(4) 防热:防热的目的主要是为了避免热胀冷缩引起镜片的开胶与脱落。

2. 光学系统的擦拭 平时对显微镜的各光学部分的表面,用干净的毛笔清扫或用擦镜纸擦拭干净即行。在镜片上有抹不掉的污物、油渍或手指印时,镜片生霉、生雾以及长期停用后复用时,都需要先进行擦拭再使用。

(1) 擦拭范围:目镜和聚光镜允许拆开擦拭。物镜因结构复杂,装配时又要专门的仪器来校正才能恢复原有的精度,故严禁拆开擦拭。

拆卸目镜和聚光镜时,要注意以下几点:

1) 小心谨慎。

2) 拆卸时,要标记各元件的相对位置(可在外壳上划线作标记)、相对顺序和镜片的正反面,以防重装时弄错。

3) 操作环境应保持清洁、干燥。拆卸目镜时,只要从两端旋出上下两块透镜即可。目镜内的视场光阑不能移动。否则,会使视场界线模糊。聚光镜旋开后严禁进一步分解其上透镜。因其上透镜是油浸的,出厂时经过良好的密封,再分解会破坏它的密封性能而损坏。

(2) 擦拭方法:先用干净的毛笔或吹风球除去镜片表面的灰尘,然后用干净的绒布从镜片中心开始向边缘作螺旋形单向运动。擦完一次把绒布换一个地方再擦,直至擦净为止。如果镜片上有油渍、污物或指印等擦不掉时,可用柳枝条裹上脱脂棉,蘸少量酒精和乙醚混合液(酒精 80%,乙醚 20%)擦拭。如果有较重的霉点或霉斑无法除去时,可用棉签蘸水润湿后粘上碳酸钙粉(含量为 99%以上)进行擦拭。擦拭后,应将粉末清除干净。镜片是否擦净,可用镜片上的反射光线进行观察检查。要注意的是,擦拭前一定要将灰尘除净,否则,灰尘中的砂粒会将镜面划起沟纹。不准用毛巾、手帕、衣服等去擦拭镜片。酒精乙醚混合液不可用得太多,以免液体进入镜片的粘接部使镜片脱胶。镜片表面有一层紫蓝色的透光膜,不要误作污物将其擦去。

3. 机械部分的擦拭 表面涂漆部分,可用布擦拭。但不能使用酒精、乙醚等有机溶剂擦,以免脱漆。没有涂漆的部分若有锈,可用布蘸汽油擦去。擦净后重新上好防护油脂即可。

(薛占瑞)

第二节 荧光显微镜的结构和使用

【实验目的】

掌握荧光显微镜的操作方法;了解荧光显微镜的结构及原理。

【实验原理】

荧光显微镜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、激发检测样品内地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。荧光显微镜用于研究细胞内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等。细胞中有些物质,如叶绿素等,受紫外线照射后可发荧光;另有一些物质本身虽不能发荧光,但如果用荧光染料或荧光抗体染色后,经紫外线照射亦可发荧光,荧光显微镜就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一、荧光显微镜由普通光学显微镜加上一些附件(荧光光源、荧光镜组件等)组成

1. 光源 现在多采用 100W 或 200W 的超高压汞灯作光源,它发射很强的紫外和蓝紫光,足以激发各类荧光物质,因此,为荧光显微镜普遍采用。超高压汞灯(100W 或 200W)光源的电路包括变压、镇流、启动几个部分。在灯室上有调节灯泡发光中心的系统,灯泡球部后面安装有镀铝的凹面反射镜,前面安装有集光透镜。

2. 滤色系统 滤色系统是荧光显微镜的重要部位,由激发滤片和压制滤片组成。滤片型号,各厂家名称常不统一。滤片一般都以基本色调命名,前面字母代表色调,后面字母代表玻璃,数字代表型号特点。如德国产品(Schott)BG12,就是种蓝色玻璃,B 是蓝色的第一个字母,G 是玻璃的第一个字母;我国产品的名称已统一用拼音字母表示,如相当于 BG12 的蓝色滤片名为 QB24,Q 是青色(蓝色)拼音的第一个字母,B 是玻璃拼音的第一个字母。

(1) 激发滤片:根据光源和荧光色素的特点,可选用以下三类激发滤片,提供一定波长范围的激发光。

紫外光激发滤片:此滤片可使 400nm 以下的紫外光透过,阻挡 400nm 以上的可见光通过。常用型号为 UG-1 或 UG-5,外加一块 BG-38,以除去红色尾波。紫外蓝光激发滤片:此滤片可使 300~450nm 范围内的光通过。常用型号为 ZB-2 或 ZB-3,外加 BG-38。紫蓝光激发滤片:它可使 350~490nm 的光通过。常用型号为 QB24(BG12)。近年开始采用金属膜干涉滤片,由于针对性强,波长适当,因而激发效果比玻璃滤片更好。如西德 Leitz 厂的 FITC 专用 KP490 滤片和罗达明的 S546 绿色滤片,均远比玻璃滤片效果好。激发滤片分薄厚两种,一般暗视野选用薄滤片,亮视野荧光显微镜可选用厚一些。基本要求是以获得最明亮的荧光和最好的背景为准。

(2) 压制滤片:压制滤片的作用是完全阻挡激发光通过,提供相应波长范围的荧光。与激发滤片相对应,常用以下 3 种压制滤片。

1) 紫外光压制滤片:可通过可见光、阻挡紫外光通过。能与 UG-1 或 UG-5 组合。常用 GG-3K430 或 GG-6K460。

2) 紫蓝光压制滤片:能通过 510nm 以上波长的光(绿到红),能与 BG-12 组合。通常用 OG-4K510 或 OG-1K530。

3) 紫外蓝光压制滤片:能通过 460nm 以上波长的光(蓝到红),可与 BG-3 组合,常用 OG-11K470AK 490, K510。

3. 反光镜 反光镜的反光层一般是镀铝的,因为铝对紫外光和可见光的蓝紫区吸收少,反射达 90%以上,而银的反射只有 70%;一般使用平面反光镜。

4. 聚光器 专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成。分明视野聚光器和暗视野聚光器两种,还有相差荧光聚光器。

(1) 明视野聚光器:在一般荧光显微镜上多用明视野聚光器,它具有聚光力强,使用方便,特别适于低、中倍放大的标本观察。

(2) 暗视野聚光器:暗视野聚光器在荧光显微镜中的应用日益广泛。因为激发光不直接进入物镜,因而除散射光外,激发光也不进入目镜,可以使用薄的激发滤片,增强激发光

的强度,压制滤片也可以很薄,因紫外光激发时,可用无色滤片(不透过紫外光)而仍然产生黑暗的背景。从而增强了荧光图像的亮度和反衬度,提高了图像的质量,观察舒适,可能发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

(3) 相差荧光聚光器:相差聚光器与相差物镜配合使用,可同时进行相差和荧光联合观察,既能看到荧光图像,又能看到相差图像,有助于荧光的定位准确。一般荧光观察很少需要这种聚光器。

5. 物镜 各种物镜均可应用,但最好用消色差的物镜,因其自体荧光极微且透光性能(波长范围)适合于荧光。由于图像在显微镜视野中的荧光亮度与物镜镜口率的平方成正比,而与其放大倍数成反比,所以为了提高荧光图像的亮度,应使用镜口率大的物镜。尤其在高倍放大时其影响非常明显。因此对荧光不够强的标本,应使用镜口率大的物镜,配合以尽可能低的目镜(4×,5×,6.3×等)。

6. 目镜 在荧光显微镜中多用低倍目镜,如5×和6.3×。过去多用单筒目镜,因为其亮度比双筒目镜高一倍以上,但目前研究型荧光显微镜多用双筒目镜,观察很方便。

7. 落射光装置 新型的落射光装置是从光源来的光射到干涉分光滤镜后,波长短的部分(紫外和紫蓝)由于滤镜上镀膜的性质而反射,当滤镜对向光源呈45°倾斜时,则垂直射向物镜,经物镜射向标本,使标本受到激发,这时物镜直接起聚光器的作用。同时,波长长的部分(绿、黄、红等),对滤镜是可透的,因此,不向物镜方向反射,滤镜起了激发滤板作用,由于标本的荧光处在可见光长波区,可透滤镜而到达目镜观察,荧光图像的亮度随着放大倍数增大而提高,在高放大时比透射光源强。它除具有透射式光源的功能外,更适用于不透明及半透明标本,如厚片、滤膜、菌落、组织培养标本等的直接观察。近年研制的新型荧光显微镜多采用落射光装置,称之为落射荧光显微镜。

荧光显微镜和普通显微镜有以下的区别:

- (1) 照明方式通常为落射式,即光源通过物镜投射于样品上。
- (2) 光源为紫外光,波长较短,分辨力高于普通显微镜。
- (3) 有两个特殊的滤光片,光源前的用以滤除可见光,目镜和物镜之间的用于滤除紫外线,用以保护人眼。

荧光显微镜也是光学显微镜的一种,主要的区别是二者的激发波长不同。由此决定了荧光显微镜与普通光学显微镜结构和使用方法上的不同。荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本工具。

荧光显微镜的结构如图 1-1-2-1。

【实验方法】

- (1) 打开电源开关,待超高压汞灯弧光至稳定状态。
- (2) 根据样品荧光指示剂,在光路的插槽中插入所要求的激发滤片/双色束分离器/阻断滤片的插块。旋转荧光组件室数码圆盘,分别对应以下标志:
WB—适用于 FITC 荧光抗体染色的样品观察,阳性染色为绿色。
WG—适用于 PE 或 Cy3 荧光抗体和罗丹明染色的样品观察,阳性染色为红色。
WU—适用于紫外光荧光抗体染色的样品观察,阳性染色为蓝色。
- (3) 将荧光指示剂标记好的样品放在载物台上。
- (4) 将物镜放在光路中聚焦样本,并按需要选择 ND 滤光片。
- (5) 用低倍镜观察,根据不同型号荧光显微镜的调节装置,调节视场光阑和孔径光阑,