

高等学校教材

# 医学形态学

## 实验指导 —— 细胞生物学与遗传学分册

供基础、临床、护理、预防、口腔医学类专业用

主编 杨保胜 李晓文  
副主编 丰慧根 闫文义  
张进忠



# 医学形态学

主编 王 强

副主编 李 强 张 强

主审 王 强 副主审 李 强 张 强

主 编 王 强  
副 编 李 强 张 强  
参 编 王 强 李 强 张 强



高等学校教材

供基础、临床、护理、预防、口腔医学类专业用

# 医学形态学实验指导

——细胞生物学与遗传学分册

主 编 杨保胜 李晓文

副主编 丰慧根 闫文义 张进忠

编 者 (以姓氏笔画为序)

丰慧根 (新乡医学院)

井长勤 (新乡医学院)

王天云 (新乡医学院)

王红霞 (新乡医学院)

刘涌涛 (新乡医学院)

闫文义 (河南大学医学院)

张会勇 (新乡医学院)

张光谋 (新乡医学院)

张秀华 (新乡医学院)

张进忠 (河南职工医学院)

李晓文 (郑州大学医学院)

杨保胜 (新乡医学院)

单琳琳 (河南师范大学)

周 爽 (新乡医学院)

林俊堂 (新乡医学院)

穆灵敏 (新乡医学院)

人 民 卫 生 出 版 社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

医学形态学实验指导——细胞生物学与遗传学分册/杨保胜等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2005. 9

ISBN 978 - 7 - 117 - 07021 - 8

I. 医... II. 杨... III. ①人体细胞学: 生物学—实验 ②医学遗传学—实验 IV. R32 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 095436 号

## 医学形态学实验指导

——细胞生物学与遗传学分册

主 编: 杨保胜等

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010 - 67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010 - 67605754 010 - 65264830

印 刷: 北京智力达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 16.75 插页: 1

字 数: 391 千字

版 次: 2005 年 9 月第 1 版 2008 年 6 月第 1 版第 3 次印刷

标准书号: ISBN 978 - 7 - 117 - 07021 - 8/R · 7022

定 价: 30.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

# 高等学校五年制临床医学专业 实验教材编写说明

医学是一门实践性较强的学科，不仅要求学生具有扎实的理论基础，同时也要求学生具有较强的动手能力和严谨的科学态度。因此，加强实验教学，改革实验教学内容、体系和方法，培养能适应社会发展需要的高素质医学人才，已成为高等医学院校面临的重大课题。为此，我们组织部分院校编写了这套与全国高等学校规划教材相配套的临床医学专业实验教材。该套教材的编写，旨在进一步加强实验教学，规范实验教学内容，提高教学质量，为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。

## 高等学校五年制临床医学专业 实验教材目录

1. 生理学实验指导	主编 葛 凤
2. 病理学实验指导	主编 王学春
3. 医学免疫学实验指导	主编 司传平
4. 医学微生物学实验指导	主编 于爱莲
5. 生物化学实验指导	主编 刘玉庆
6. 人体解剖学实验指导	主编 臧卫东
7. 组织学与胚胎学实验指导	主编 张钦宪
8. 药理学实验指导	主编 吴基良
9. 病理生理学实验指导	主编 赵小玉
10. 医学机能学实验指导	主编 刘巨源
11. 医学形态学实验指导——细胞生物学与遗传学分册	主编 杨保胜
12. 医学形态学实验指导——病原生物学与免疫学分册	主编 王 辉
13. 医学形态学实验指导——组织胚胎学与病理学分册	主编 杨廷桐

# [ 前 言 ]

现代生命科学和基础医学发展迅速，研究成果及相应的新技术、新方法精彩纷呈，令人有目不暇接之感，许多实验技术对现在与未来的生物医学都正在或将产生深远的影响。

近年来，随着细胞生物学和遗传学学科的迅速发展，教学内容也随之有了较多更新，细胞生物学和医学遗传学作为基础医学课程，列入高等院校临床医学专业的教学计划中，并开设了实验课。为了提高教学水平，反应更具科学性、先进性和实用性的实验内容，编者根据教育部《临床医学专业本科教学基本要求》和课程的设置，在参阅中外文献和仔细分析我国基础医学课程教学现状的基础上，学习兄弟院校的教学经验和信息资料，结合我们多年来教学科研的实践体会和教学改革成果，编写了《医学形态学实验指导——细胞生物学与遗传学分册》一书，供高等院校临床医学及其他医学类专业学生使用，旨在加强学科的渗透交叉，减少实验内容的重复，提高学生的实验技能。

根据教育部有关加强学生素质教育和培养创新人才的要求，本实验指导注重实验内容的更新，减少部分验证性或演示性实验，开设综合性、设计性（探索性）实验，在实验内容上进一步明确层次。将实验课分为：①基础性实验：着重培养学生的动手能力，分析问题和解决问题的能力，培养学生严谨的科学态度，以基本技能和基本操作为主。②综合性实验：综合各学科的内容，着重培养学生应用新知识、新技术的能力和科学思维的能力。③设计性实验（或称探索性实验）：学生在教师的指导下进行选题、查阅文献资料、设计实验、独立完成相关实验研究、总结，最后完成论文。目的是初步培养学生科学研究的能力，为开展科学研究和完成毕业论文打下基础。本书强化实验技能的训练和科学思维方法的培养，并充分采用现代教育技术设备辅助实验课进行教学，提高学生的动手能力和解决问题的能力。考虑到各个院校所能开设的实验内容不同，同种试剂实验涉及2个以上实验内容时，为避免重复和方便查找，其配制方法列在书后的相应附录中。本书是一本实用性强的细胞生物学与医学遗传学实验教材，可作为不同实验基础条件的综合大学医学院和医学院校的本科生及研究生使用，也可作为从事生命科学、医学和农学工作人员的参考书。

本书的出版，得益于卫生部教材办公室及人民卫生出版社领导的鼎力支持，同时也得到了新乡医学院、郑州大学医学院、河南大学医学院和河南职工医学院等参编院校领导、教务处的大力支持和具体指导，同行专家也进行了认真的审阅和核对，在此一并表示衷心感谢。

本书编写人员虽然各具相应的专业特长，且都是长期从事教学科研的教师，但限于编者的知识和能力，加之编写综合性和设计性实验是一次新的尝试，可供参考和借鉴的资料不多，本书在形式和内容方面都难免存在这样或那样的缺点和不足，殷切希望使用本教材的同学和同仁批评指正。

编者

2005年5月

# [目 录]

## 第一篇 医学细胞生物学实验技术

第一章 显微镜技术	1
实验一 光学显微镜技术	1
一、普通光学显微镜的结构和使用	4
二、特殊光学显微镜的结构与使用	8
实验二 显微摄影技术	16
一、照相显微镜各部件的选择及应用	16
二、感光片(胶卷)的选择	17
三、滤光片的选择	18
四、感光片的暗室加工	19
实验三 电子显微镜技术	20
一、透射电镜的结构和使用	23
二、扫描电镜的结构和使用	23
三、电镜样品制备技术和方法	24
四、电镜样品的观察、识别和分析	25
第二章 细胞的形态结构与细胞器	27
实验四 细胞的形态结构与细胞器	27
一、细胞结构的观察	28
二、细胞器的超活染色与观察	30
三、细胞的超微结构	35
四、细胞的显微测量	37
实验五 死活细胞的鉴别与分离	39
一、染色排除法鉴别死活细胞	39
二、荧光排除法鉴别死活细胞	40
三、死活细胞分离	40
实验六 细胞组分(细胞器)的分级分离	41
一、细胞核的分离提取	41
二、高速离心分离提取线粒体	42
第三章 细胞生理与细胞化学	44

实验七 细胞的生理活动 .....	44
一、细胞的吞噬活动 .....	44
二、草履虫纤毛运动及食物泡的形成 .....	45
三、暗视野观察细胞的纤毛和鞭毛运动 .....	45
四、细胞膜的渗透性实验 .....	46
五、细胞的凝集反应 .....	47
实验八 细胞化学 .....	48
一、普通细胞化学 .....	49
二、酶细胞化学 .....	50
三、荧光细胞化学 .....	51
四、免疫细胞化学 .....	52
<b>第四章 综合性实验 .....</b>	<b>53</b>
实验九 骨髓细胞染色体标本的制备及观察 .....	53
一、小鼠骨髓染色体标本的制备与观察 .....	53
二、人骨髓细胞染色体标本的制备技术 .....	55
实验十 细胞增殖与细胞凋亡 .....	56
一、有丝分裂标本制备与观察 .....	57
二、减数分裂标本制备与观察 .....	59
三、细胞凋亡的检测 .....	64
<b>第五章 细胞培养与细胞工程技术 .....</b>	<b>66</b>
第一节 培养细胞的生存条件 .....	66
第二节 细胞培养的基本技术 .....	70
第三节 体外培养细胞的取材方法与原代细胞培养 .....	71
第四节 培养细胞的生长特性与形态分型 .....	73
第五节 培养细胞的计数、生长曲线与分裂指数测定 .....	75
第六节 培养细胞的冻存、复苏与运输 .....	75
第七节 细胞系或细胞株的建立 .....	76
实验十一 动物细胞培养及相关实验技术 .....	77
一、实验室无菌操作技术 .....	78
二、细胞的原代培养技术 .....	78
三、细胞的传代培养技术 .....	80
四、体外培养细胞的计数和活力测定技术 .....	81
五、体外培养细胞的冻存与复苏技术 .....	82
实验十二 细胞融合与细胞核移植技术 .....	83
一、细胞融合技术 .....	85
二、细胞核移植技术 .....	85
<b>第二篇 医学遗传学实验技术</b>	
<b>第六章 细胞遗传学实验技术 .....</b>	<b>88</b>
实验十三 人类性染色质标本制备技术 .....	89



一、X 染色质标本制备与观察 .....	89
二、Y 染色质标本制备与观察 .....	90
实验十四 人类染色体标本制备技术 .....	91
一、外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备技术 .....	92
二、其他组织细胞的染色体标本制备 .....	95
实验十五 人类染色体显带与染色体高分辨显带技术 .....	99
一、人类染色体 G 显带标本制备 .....	100
二、人类染色体高分辨显带技术 .....	101
三、人类染色体 C 显带标本制备 .....	103
四、人类染色体 Q 显带标本制备 .....	104
五、人类染色体 R 显带标本制备 .....	105
六、人类染色体 T 显带标本制备 .....	106
七、人类染色体 NOR 带标本制备 .....	107
实验十六 核型分析与人类异常核型观察分析 .....	109
一、人类正常非显带染色体核型分析 .....	109
二、人类染色体 G 显带核型分析 .....	112
三、人类异常核型的观察和分析 .....	115
实验十七 离体细胞染色体畸变检测方法及技术 .....	118
一、受试物对细胞增殖的半数抑制剂量测定 .....	118
二、试验设计 .....	119
三、染色体畸变标本制备及观察 .....	119
实验十八 人类脆性 X 染色体标本制备 .....	120
一、外周血淋巴细胞脆性 X 染色体标本制备 .....	122
二、绒毛细胞脆性 X 染色体标本制备 .....	122
三、羊水细胞脆性 X 染色体标本制备 .....	122
四、脆性 X 染色体标本观察 .....	123
实验十九 人类 SCE 和微核检测技术 .....	123
一、SCE 标本制备与观察 .....	125
二、微核检测技术 .....	126
实验二十 荧光原位杂交技术 .....	129
<b>第七章 生化遗传学实验技术 .....</b>	<b>133</b>
实验二十一 先天性代谢病筛查的细菌抑制实验 .....	133
实验二十二 先天性代谢病的尿筛查实验 .....	135
一、氨基酸代谢病的尿筛查方法 .....	136
二、糖代谢病的尿筛查实验 .....	141
实验二十三 酶活性测定技术 .....	143
<b>第八章 分子遗传学实验技术 .....</b>	<b>146</b>
实验二十四 基因组 DNA 的提取、纯化、酶解和电泳分离 .....	146
一、DNA 的提取 .....	149

二、DNA 的纯化 .....	151
三、人类基因组 DNA 的限制性核酸内切酶水解 .....	152
四、DNA 酶切片断的凝胶电泳分离 .....	152
实验二十五 聚合酶链反应扩增 DNA 片段及检测 .....	156
一、PCR 扩增 DNA 片断及检测 .....	157
二、其他几种 PCR 相关技术介绍 .....	158
实验二十六 PCR-SSCP 法检测分析技术 .....	160
实验二十七 致病基因的 RFLP 连锁分析 .....	163
实验二十八 分子杂交技术 .....	165
一、斑点杂交 .....	166
二、等位基因特异性寡核苷酸杂交法 .....	167
三、Southern 印迹杂交 .....	167
四、Northern 印迹杂交 .....	171
五、Western 印迹杂交 .....	172
实验二十九 STR 位点复合扩增技术 .....	173
一、DNA 提取 .....	174
二、PCR 扩增 .....	175
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	175
四、银染检测 .....	176

### 第三篇 设计性与探索性实验

<b>第九章 实验设计的原理与方法</b> .....	177
第一节 实验设计的概念、特点和分类 .....	177
第二节 实验设计的基本要素 .....	178
第三节 实验设计的基本原则 .....	179
第四节 常用的实验设计思路 .....	181
第五节 实验设计的基本内容与方法 .....	181
<b>第十章 细胞生物学与遗传学实验设计与选题</b> .....	183
第一节 设计性实验及其在人才培养中的作用 .....	183
第二节 设计性实验的操作过程 .....	185
第三节 实验设计的实例分析 .....	187
第四节 可供实验设计选题目录 .....	189
<b>附 录</b> .....	194
附录 I 实验器械的清洗和处理 .....	194
附录 II 实验室常用灭菌和除菌方法 .....	196
附录 III 细胞生物学与遗传学实验常用试剂的配制 .....	198
附录 IV 常用培养基和抗生素的配制 .....	208
附录 V 离心机转速与离心力的列线图(换算) .....	209
附录 VI 流式细胞仪分析技术 .....	210

附录 VII	生物样品的储存、邮送与实验室安全 .....	214
附录 VIII	常用生物学数据 .....	216
附录 IX	实验常用软件和数据库介绍 .....	218
附录 X	有关细胞生物学和医学遗传学的主要网站 .....	227
附录 XI	人类某些遗传性状(疾病)的调查分析 .....	228
附录 XII	系谱分析 .....	232
附录 XIII	皮纹分析 .....	236
附录 XIV	遗传病的发病风险估计、Bayes 法的应用及常见遗传病的 遗传咨询 .....	242
附录 XV	缩略语表 .....	250
<b>实验报告书写要求</b> .....		<b>252</b>
<b>参考文献与网站</b> .....		<b>255</b>

# 第一篇 医学细胞生物学实验技术

医学细胞生物学(medical cell biology)是以细胞生物学和分子生物学(molecular biology)为基础,探讨研究人体细胞发生、发展、成长、衰老、死亡的生命活动规律以及发病机制和防治的科学。细胞生物学被认为是当今生命科学中的重要核心学科之一。

细胞生物学的发展也和其他学科一样,在很大程度上依赖于研究技术的进步与仪器设备的改进。一种新技术或新方法的创立与应用,常常会给学科开辟一个新的领域,或给某一学科带来革命性的变化。

细胞生物学实验技术很多,原理和操作步骤各不相同,包括细胞、亚细胞和分子水平三个层次的研究技术,本篇主要依据国家教育部临床医学专业本科教学基本要求,精选部分常用实验技术,以期对细胞生物学研究方法和技术有个概貌的了解。

## 第一章 显微镜技术

显微镜(microscope)是光学显微镜技术的主要工具,自问世以来,已有400年历史。1590年前后,荷兰的Hans父子创造了放大10倍的原始显微镜。17世纪以后英国物理学家Robert Hooke和意大利的解剖学家Marcollo Malpighi创制了性能较好的显微镜,分别用于植物学和医学研究。19世纪末,Abbe与Zeiss合作制造了更高级的显微镜,放大率可达2000倍左右。

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;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、细胞通讯、细胞免疫和遗传学等功能的研究。近代已制成显微分光光度计(microspectrophotometer),这是一种显微镜与分光装置联合的仪器,既能观察细胞内的微细结构,又能定性、定量和定位地测定细胞内各种组成成分,并能对细胞和组织内的某些化学物质进行定量测量。

### 实验一 光学显微镜技术

光学显微镜(light microscopy)自发明以来在细胞生物学研究中发挥了重要作用。至今,细胞生物学工作者仍然离不开最普通的光学显微镜,而且许多现代生物学技术与光镜技术的结合使光学显微镜展示出了新的活力,更广泛地应用于细胞生物学研究之中。

## 【实验目的】

通过本次实验,熟悉普通光学显微镜各部分的结构和功能,掌握低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法及使用显微镜的注意事项,学会计算显微镜放大倍数的方法,了解光学显微镜的维护方法。熟悉相差显微镜的原理、用途和使用方法,熟悉荧光显微镜的原理、用途和使用方法,了解暗视野显微镜的原理、用途和使用方法。

## 【实验原理】

### 1. 显微镜的成像原理

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。成像过程为物体在物镜后方形形成倒立放大的实像;此像在目镜下焦点以内,通过目镜又形成倒立放大的虚像;该像恰在眼睛的明视距离内,通过眼球晶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。

光通过透镜成像时会产生球面差、色差和像散现象。根据物理学原理,透镜的表面呈球面者,通过透镜边缘的光线比通过透镜中轴的光线偏折大,因而所有的光线不能相交于一点而形成球面像差。用几块凸凹透镜组合则能消除此种球差。

多色光束组成的光源,各色光的折射率不同,波长长的红光折射率小而波长短的紫光折射率大,因而不同颜色的光所成的像,位置和大小都不相同,这种误差称为色差。用色散能力不同而折射率相同的材料制成凸凹透镜组合,则可校正色差。

像散又称为像面弯曲,是由于物体远离主光轴而造成的像差。当物体远离主光轴而发出的光线与主光轴形成一相当大的夹角时,光线经过透镜折射后成为一椭圆形光锥,在此路程中不同地方先后两次形成条状像,两者互相垂直,在两者之间又形成一圆形像,这种失真现象叫做像散。消除的方法也是利用两个以上质料和形状不同的透镜组合起来,配合适当的光阑组成透镜组。

### 2. 显微镜的性能

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。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。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。聚光镜的数值孔径一般为 1.2、1.25、1.3 和 1.4。

数值孔径以公式表示为  $NA = n \sin \frac{\alpha}{2}$ ,式中  $n$  为物镜与被检物体之间介质的折射率, $\alpha$  为镜口角(angular aperture),指从位于物镜光轴上标本的一个点发出光线,伸长到物镜前透镜的有效直径的两端所形成的夹角。

从上式得知镜口角越大,进入物镜的光越多;介质的折射率越大,则数值孔径值越大。这些都可使分辨能力提高、物像清晰。

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。

$$\text{分辨距离}(S) = \frac{\lambda}{2NA} \quad \text{分辨率} = \frac{1}{S} = \frac{2NA}{\lambda}$$

从上式得知,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。

总放大率 = 物镜放大率 × 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。如总放大倍数  $M = 800 \times$ ,可以取  $M_1 = 40 \times$  或  $100 \times$ ,  $40 \times$  的物镜其 NA 值为 0.65,而  $100 \times$  的物镜 NA 值是 1.30,应取  $100 \times$  物镜,所配目镜  $M_2 = 20 \times$  或  $8 \times$ ,最好取  $8 \times$  者乘以  $100 \times$  即可得到  $800 \times$ ;若取  $40 \times$  物镜和  $20 \times$  目镜,则由于目镜将物镜所产生的像再放大的同时,会使物镜的缺陷更加清楚,所以目镜放大倍数过高时,反而得不到清晰的物像。

(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:  $T = \frac{kn}{M \times NA}$ ,式中  $k = 0.24$  为一个常数, n 为介质的折射率, M 为总放大倍数, NA 为镜口率。

从上式可知折光率高的封片剂可使 n 值增大,使用合适的物镜和目镜令其放大倍数配合得当,同时兼顾物镜的数值孔径才能保证高的分辨率。焦点深度的计算方法如下:当折射率为定值,即 n 值固定且够大,取  $M = 40 \times$ ,  $NA = 0.25$ ,物镜为  $10 \times$ ,目镜为  $4 \times$ ,其焦点深度等于  $36 \mu\text{m}$ ;若取  $M = 700$ 、 $NA = 1.25$ 、物镜为  $100 \times$ 、目镜为  $7 \times$  时,焦点深度等于  $0.42 \mu\text{m}$ 。

T 值大、焦点深可保证观察到被检物体的全层,但 T 与 M 和 NA 呈反比,如拟得高值的 M 和 NA, T 自然变为小值。因此使用高倍物镜或油镜时必须运用调焦装置从上到下观察物体的全层来弥补焦点深度小的缺点。

(5) 镜像亮度(light of image, L):镜像亮度与数值孔径的平方呈正比,与总放大率的平方呈反比。即  $L = \left(\frac{NA}{M}\right)^2$ ,  $M^2 = (M_1 \times M_2)$ 。因而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。例如总放大率为 200,选用数值孔径为 0.25 的物镜时,其镜像亮度为:

$$L_1 = \left(\frac{0.25}{10 \times \cdot 20 \times}\right)^2 = \frac{0.0625}{40000}$$

选用数值孔径为 0.75 的物镜时,其镜像亮度为:

$$L_2 = \left(\frac{0.75}{40 \times \cdot 5 \times}\right)^2 = \frac{0.5625}{40000}$$

$L_2$  的亮度是  $L_1$  的 9 倍。

(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。

## 【实验器材和试剂】

1. 器材 普通光学显微镜、擦镜纸、A 字母装片、口腔上皮细胞涂片、蛙血涂片、人血涂片、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、培养细胞、培养细胞涂片、擦镜纸、吸水纸、载玻片、盖玻片。

2. 试剂 乙醚酒精、二甲苯(xylenol)、镜油、细胞培养用液、吖啶橙荧光染料。

## 【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。它是生命科学和医学常用的必备工具之一。因此,可以形象的比喻,显微镜是医生的“眼睛”。

#### (一) 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为暗。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系统和机械系统两部分。前者是显微镜的主要部件,决定着光学性能,但仍需后者的精密配合,才能有效地发挥作用。

#### 1. 光学系统

光学系统(optical system)由物镜(objective)、目镜(ocular, eyepiece)和照明装置(illuminating apparatus)组成。前两种部件使所观察的物体在显微镜中成像;后者则能改变入射光的性质和强度。

(1) 物镜:物镜由凸凹透镜组成,在物镜下端靠近标本的称前透镜,在物镜上端的称后透镜。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。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 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。

② 物镜按放大倍数不同可分 4 类:低倍物镜的放大倍数为 1~5 倍,中倍物镜放大 5~65 倍,高倍物镜放大倍数为 65~95 倍,油浸高倍物镜放大 90~100 倍,通常以“×”代表倍数。

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,两者粘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:目镜由平凸透镜组成。在目镜镜筒下端者为场镜(field lens),上端者为接目镜(eyelens)。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。

目镜按不同的用途分为4类:①惠更斯目镜(Huygenian eyepiece):此种目镜上的场镜和接目镜均由平凸透镜组成,凸面向下,须与消色差物镜配合使用。目镜的放大倍数与接目镜的直径和目镜筒长有关,直径越小、筒长越短者的放大倍数越大。此种目镜在生物学显微镜中经常采用;②补偿目镜(compensating eyepiece):此种目镜主要用以校正红光的色差,必须与复消色差物镜配合使用。因为复消色差物镜能使蓝像大于红像,而补偿目镜则能使红像大于蓝像,正好起了补偿作用;③平场目镜(complanatic eyepiece):这种目镜能纠正像面弯曲、视野平广,常与平场物镜配合使用,用于显微镜摄影;④广角目镜(wide angle eyepiece):这种透镜厚度大,而焦点不变,光折射以后能扩大景物的视野,常配合消色差物镜使用。

(3) 照明装置:照明装置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。照明装置也称聚光器,包括聚光镜、光阑和反射镜三个器件。

① 聚光镜(condenser):聚光镜位于镜台之下,由1~3块透镜组成。最上面的一块是平面透镜,其作用为使平行光会聚在上透镜上方1.25mm处,以使光线继续射入物镜的整个镜口角,并可得到均匀的亮度。较好的聚光镜同样能消除球面像差和色差。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者一致。各种专用而有特殊功能的显微镜配备不同的聚光镜:如暗视野显微镜设有暗视野聚光镜,普通双筒显微镜设有明视野聚光镜,相差显微镜下装有转盘聚光镜。

② 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。

③ 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位。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。

#### (4) 光源与照明方法

① 光源(light source):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,加磨玻璃和滤光片也能得到同样的效果。天然光源的视野亮度与放大倍数呈反比,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。人工光源的强弱、位置、照射方向以及与显微镜之间的距离都可调节。使用人工光源时也应加滤光装置,人工光源中的弧光灯用于暗视野照明,紫外灯用于紫外显微镜,碘钨灯、氙灯、高压汞灯用于荧光显微镜和显微荧光分光光度计。

② 照明方法:根据光源光线射出的方向可分为透射照明和落射照明。透射照明的光线来自标本下方通过标本后成像,包括:中心照明(照明光束与显微镜的光轴平行,光束宽而均匀,通过标本进入物镜)、柯勒照明(Köhler illumination,是一种非平行光照明,视野内的光度均匀,用于高倍和油浸物镜观察)和斜射照明(照明光线与光轴形成一定角度,分为明视野斜射照明和暗视野斜射照明,后者的照明光线不进入物镜)三种;落射照明为光线从标本上方射入,落到物体上。这种照明适用于不透明物体的观察。在生物医学上所用的荧光显微镜和偏光显微镜采用此方法。

(5) 滤光装置:滤光片是用有色玻璃制成的镜片,放在聚光镜的下方,以控制光线的通过。为了减少色差可用滤光片造成单色光。不同波长的光其颜色也不一样,可以把可见光分成七种单色光(红、橙、黄、绿、青、蓝和紫光),波长依次为700 nm、650 nm、600 nm、550 nm、500 nm、450 nm和400 nm。其中红、绿和蓝三种光可组成白光,红与绿合为黄光,红与蓝合为紫光。

滤光片的功能是选择性地吸收某色光或某种波长的光而透过另一些色光或另一些波长的光。这样就产生出单色光而减少色差。滤光片滤过光或透过光时只是对某种光容易通过。颜色越深者吸收某种光的能力越强。蓝色滤片透过蓝光而吸收黄光,红色滤片则透过红光而吸收蓝与绿光。

滤光片的分类与用途包括:①乳白色滤片:用于强光光源,使射来的光亮度降低、光线变柔、不刺激人眼,对观察细微结构有利;②蓝色滤片:用于白炽灯光,吸收其中的黄色光,使蓝光透过多,青紫也有少量透过。此外还吸收橙红和紫红色光;③黄色滤片:使黄色光通过多,也通过少许红、橙和绿光;④绿色滤片:使绿和黄两色光通过,尤以绿色者为多,吸收蓝紫光 and 红光;⑤红色滤片:透过红色光最多,橙黄光也通过一些,而吸收绿、青、蓝紫几种光;⑥中性密度滤片:对各种波长的光均匀吸收,因而只减少光强而不影响光谱分布。用于校准仪器和调节照相时的光强;⑦防热滤片:安放在靠光源处,吸收光源的热辐射,使样品不致受热损伤而起保护活性的作用。

使用上述各种滤片可以校正光束而增加影像的反差,以清晰地显示微细结构。

(6) 显微镜的光轴:在显微镜的光学系统中,物镜、目镜和聚光镜与光阑中心形成的直线称为光轴。因目镜是固定的而物镜和聚光镜的位置是可变的,故必须经常调整方能保证光轴的一致。在使用相差和暗视野显微镜时,聚光镜的中心和光阑的中心必须一致方能进行样品的观察。

物镜与聚光镜两者的光轴必须一致,聚光镜与物镜的距离应该合适,光阑启开的大小也应适度。这三个因素可以保证有足够的光线进入物镜,使显微镜发挥其分辨能力。

## 2. 机械系统

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