

XIBAO SHENGWUXUE
JI XIBAO GONGCHENG
SHIYAN

细胞生物学 及细胞工程实验

主 编 张盛周
副主编 夏行权 王宝娟

安徽人民出版社

安徽师范大学特优强专业
——生物科学建设基金资助项目

理科

XIBAO SHENGWUXUE
JI XIBAO GONGCHENG
SHIYAN

细胞生物学 及细胞工程实验

主 编 张盛周
副主编 夏行权 王宝娟

安徽人民出版社

内 容 提 要

本教程是本着系统性、先进性、可行性和实用性的原则选定实验内容编写而成。从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面上设置实验项目。基础性实验内容属细胞生物学和细胞工程的最基本的实验方法和技术。综合性实验属多技术和多层次的综合性实验。研究性实验设置了5个实验,主要用于培养学生运用细胞生物学与细胞工程的实验技术解决一些理论与实际问题的能力,供学生开展创新性实验时参考。

本教程是大学本科细胞生物学和细胞工程的基础实验教材,适用于综合性大学、师范院校、农林院校和医学院校生物科学、生物技术及其相关专业的学生使用,也可供相关专业的研究生和有关科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学及细胞工程实验/张盛周主编. —合肥:安徽人民出版社, 2007
ISBN 978 - 7 - 212 - 03185 - 5

I. 细… II. 张… III. ①细胞生物学—实验—高等学校—教材 ②细胞工程—实验—高等学校—教材 IV. Q2 - 33 Q813 - 33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第191238号

细胞生物学及细胞工程实验

张盛周 主编

出版发行:安徽人民出版社

地 址:合肥市政务文化新区圣泉路1118号出版传媒广场8楼

发 行 部:0551-3533258 3533268 3533292(传真) 邮编:230071

组 编:安徽师范大学编辑部 电话:0553-3937079 3883579

经 销:新华书店

印 制:芜湖新欣传媒有限公司

开 本:787×960 1/16 印张:9.375 字数:179千

版 次:2009年12月第1版 2009年12月第1次印刷

标准书号:ISBN 978 - 7 - 212 - 03185 - 5

定 价:16.00元

本版图书凡印刷、装订错误可及时向承印厂调换

前 言

细胞生物学是在不同层次（显微、亚显微与分子水平）上研究细胞基本生命活动规律的科学，以研究细胞结构与功能、细胞增殖、分化、衰老与凋亡、细胞信号传递、真核细胞基因表达与调控、细胞起源与进化等为主要内容。细胞工程是按照一定的设计方案，通过在细胞、亚细胞或组织水平上进行实验操作，获得重构的细胞、组织、器官以及个体，创造优良品种和产品的综合性生物工程。细胞生物学是细胞工程的理论基础，细胞工程既是一门独立的学科，也属细胞生物学的应用领域。两者均以细胞为研究和操作对象，联系紧密，为此，我们把这两门学科的实验内容通过优化整合编在了一起。

细胞生物学是生命科学的重要理论基础学科，细胞工程也是现代生物技术的基础和公用技术平台，这两门学科的实验涉及的内容非常广泛。我们本着系统性、先进性、可行性和实用性的原则选定实验内容。从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面上设置实验项目，突出综合能力和创新能力的培养。基础性实验内容涉及细胞形态与结构的观察、流式细胞术、细胞测量与计数、细胞器的分级分离、细胞器与细胞骨架的观察、细胞生理、细胞分裂、细胞凋亡、细胞培养、细胞复苏与冻存、细胞转染等方面，共计 18 个实验，属细胞生物学和细胞工程的最基本的实验方法和技术。通过这些实验不仅可让学生学会细胞生物学和细胞工程的基本研究手段，而且可增进其对细胞形态结构和基本生命活动的认识。综合性实验主要包括石蜡切片与细胞化学技术、动植物染色体标本的制备与观察、免疫荧光与原位杂交技术、细胞传代培养及其增殖动力学检测、细胞融合、杂交瘤技术、利用根瘤农杆菌介导植物细胞的遗传转化技术及细胞核移植技术，共计 9 个实验，属多技术和多层次的综合性实验。这些实验难度较大，但学生了解和掌握这些实验技能有助于其将来从事细胞生物学和细胞工程领域更深层次的研究。由于这些实验持续时间较长，开展起来可能有些困难，建议教师可带领部分学生利用课余时间多做准备实验，将实验中的一些关键环节留在实验课时进行。如我们在开展石蜡切片与细胞化学技术的实验时，让一部分学生利用课余时间来取材、固定和脱水，然后在实验课上让学生来包埋、切片和细胞化学染色，取得了较好的效果。研究性实验设置了 5 个实验，主要用于培养学生运用细胞生物学与细胞工程的实验技术解决一些理论与实际问题的能力，供学生开展创新性实验时参考。

本教程是参考国内众多生物学和生物技术资料或网络资源博采众长结合我

们的实践经验精心编写而成的。所参考的资料我们尽可能地在参考文献中列出，如有遗漏，敬请相关作者谅解。在研究性实验中，我们也结合本教研室所从事的科学研究自行设计了部分实验，仅供广大读者参考。

由于编写时间相对较紧和编者水平所限，教程中的不完善之处在所难免，希望读者批评指正，以便再版时修正。我们衷心希望本教程能为广大读者的学习和工作带来方便和帮助，也衷心希望广大读者给予宝贵的意见和建议，使我们在相互借鉴和学习中不断地改进和提高教学水平。

本教程的编写得到了安徽师范大学生命科学学院领导和同事的大力支持，也得了细胞与遗传学教研室各位同仁的热情帮助，在此深表感谢！

目 录

前 言	1
-----------	---

第一部分 基础性实验

实验 1 特殊显微镜的原理及使用	3
实验 2 电子显微镜的原理及使用	15
实验 3 流式细胞仪的原理及使用	20
实验 4 细胞测量与计数	25
实验 5 植物细胞胞间连丝的观察	30
实验 6 细胞凝集反应及细胞膜的渗透性	32
实验 7 Feulgen 反应显示细胞中的 DNA	35
实验 8 细胞液泡系和线粒体的活体染色观察	38
实验 9 细胞骨架微丝束的普通光学显微镜观察	42
实验 10 细胞器的分级分离与观察	45
实验 11 吞噬细胞的吞噬作用观察	48
实验 12 细胞有丝分裂的观察	50
实验 13 细胞凋亡的检测	53
实验 14 植物培养基的配制与愈伤组织的诱导	57
实验 15 动物培养基的配制与动物细胞原代培养	64
实验 16 培养细胞的形态观察和活细胞的鉴定与计数	69
实验 17 细胞的冻存和复苏	72
实验 18 磷酸钙沉淀法转染细胞实验	74

第二部分 综合性实验

实验 19 石蜡切片技术及用 PAS 反应显示细胞内多糖物质	79
实验 20 动植物染色体标本的制作与观察	91
实验 21 免疫细胞化学技术显示细胞骨架微管结构	96
实验 22 染色体的荧光原位杂交实验	100
实验 23 细胞融合实验	106

实验 24	根癌农杆菌介导的植物遗传转化实验	110
实验 25	细胞传代培养及其增殖动力学检测	113
实验 26	单克隆抗体的制备及鉴定	119
实验 27	细胞核移植实验	129

第三部分 研究性实验

实验 28	两栖爬行动物冬眠前与冬眠中期肝细胞内糖原的变化	135
实验 29	不同生理状况下动物消化道内分泌细胞形态与分布的变化	136
实验 30	利用细胞遗传毒理学方法进行安全毒理评价和环境检测	137
实验 31	利用 RNA 干扰筛选肿瘤基因治疗的靶点	139
实验 32	利用植物组织培养对某种经济植物进行快繁与脱毒	141
参考文献	143

第一部分 基础性实验

实验1 特殊显微镜的原理及使用

I. 暗视场显微镜

【目的要求】

了解暗视场显微镜的基本原理及构造，掌握暗视场光挡的制作方法 & 暗视场显微镜使用方法。

【实验原理】

暗视野显微镜是利用丁达尔现象 (Tyndall phenomenon) 原理设计的，主要是使用中央遮光板或暗视野聚光器 (常用的是抛物面聚光器)，使光源的中央光束被阻挡，不能由下而上地通过标本进入物镜，使光线改变途径，倾斜地照射在观察的标本上，标本遇光发生反射或散射，散射的光线投入物镜内，因而整个视野是黑暗的。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看见。

在暗视野中所观察到的是被检物体的衍射光图像。并非物体的本身，所以只能看到物体的存在和运动，不能辨清物体的细微结构。但被检物体为非均质时，并大于 $1/2$ 波长，则各级衍射光线同时进入物镜，在某种程度上可观察物体的构造。一般暗视野显微镜虽看不清物体的细微结构，但却可分辨 $0.04\mu\text{m}$ 以上的微粒的存在和运动，这是普通显微镜 (最大的分辨力为 $0.2\mu\text{m}$) 所不具有的特性，可用以观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

【实验用品】

一、设备与器具

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

二、材料

黑藻、洋葱。

【方法与步骤】

常用的暗视场照明主要有暗视场光挡和暗视野聚光器两种方法。

一、暗视场光挡 (Dark Field Stop) 法

此法简便易行, 不要特殊设备与条件。只将中央光挡加放在聚光器下方, 滤光镜托架上即可。实验成功与否, 关键在于暗视场光挡的制作, 其中尤以光挡的直径更为重要。暗视场光挡是用黑纸、厚卡纸或金属片制成, 光挡遮住照明光束中央部分的光线, 使之不能进入物镜, 而取得暗视场照明的效果。照明光线从光挡周缘呈环形束通过聚光镜斜向照明被检样品, 被照明的样品产生反射光和散射光进入物镜, 形成可见的明亮影像。

(一) 暗视场光挡的制作方法

暗视场光挡的制作, 可采用两种不同样式, 可在滤色镜中央贴一圆形黑纸制成 (图 1-1A), 或用厚卡纸或金属片剪成如图 1-1B 的样式。

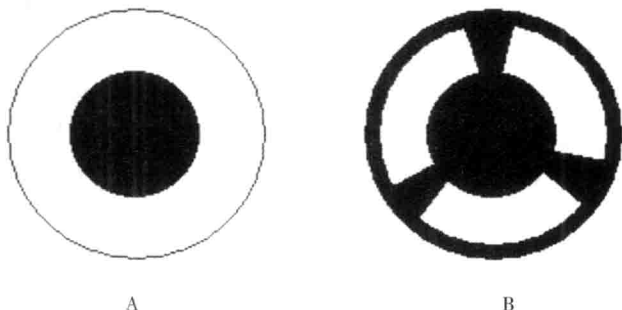


图 1-1 A. 滤色镜中央贴一圆形黑纸制成
B. 厚卡纸或金属片剪成

- (1) 将显微镜聚光器调到最高位置, 用低倍镜对好焦距。
- (2) 取下目镜, 从镜筒中观察并调节光阑的大小, 使其与镜筒中所见物镜的视野相等。

(3) 用厚黑纸剪制中央挡光板。外圈直径与滤光片框架相同, 中央部分的大小与调节好的光阑孔径一样 (可用半透明的小纸片, 放在通光孔处聚光镜镜面上, 纸上显示的光斑即为光阑的孔径, 再用圆规量取大小)。

(4) 将中央挡光板放在滤光片框架上, 开大光阑进行样品观察。

如需使用高倍镜作暗视野观察, 应按高倍镜对焦后的视野大小重新制作中央挡光板。保存好各自制作的中央遮光板, 以便在后面的实验中使用。

(二) 使用方法

- (1) 把暗视野聚光器装在显微镜的聚光器支架上。
- (2) 选用强的光源, 但又要防止直射光线进入物镜, 所以一般用显微镜灯

照明。

(3) 在聚光器和标本片之间要加一滴香柏油，目的是不使照明光线于聚光镜上面进行全反射，达不到被检物体，而得不到暗视野照明。

(4) 升降集光器，将集光镜的焦点对准被检物体，即以圆锥光束的顶点照射被检物。如果聚光器能水平移动并附有中心调节装置，则应首先进行中心调节，使聚光器的光轴与显微镜的光轴严格位于一直线上。

(5) 选用与聚光器相应的物镜，调节焦距（操作方法与普通显微镜相同），找到所需观察的物像。

二、暗视场聚光器（Dark Field Condenser）法

暗视场聚光器是为显微镜暗视场照明特制的专用聚光器。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。

（一）暗视场聚光器

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。

1. 抛物面聚光器（Paraboloid Condenser）

抛物面聚光器是一个单透镜，周围呈斜度较小的抛物线形式。由显微镜的反光镜反射出的光线，被聚光器的中部遮光板所阻挡，但侧面光线则自由进入遮光板旁和透镜边缘之间的缝。这些光线在聚光镜凹面上发生折射，结果光线集中到聚光器的界面以外，处于观察标本的平面上。

2. 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。光线照明样品后，射向物镜之外，样品产生散射和反射光进入物镜，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。

（二）暗视场聚光器的使用方法

(1) 把暗视野聚光器安装在载物台下的聚光器支架上，选用强光源照明。

(2) 在聚光器和载玻片之间加一滴柏油（严防油滴中有气泡），否则照明光线于聚光镜上面进行全反射，达不到被检物体，从而得不到暗视野照明。

(3) 把聚光器的光轴与物镜的光轴严格调在一直线上，使聚光镜焦点对准标本。

(4) 先用低倍镜观察，视野中则出现圆形光环，如果光环不在视野中心，可调整螺杆，使圆形光环移向视野中心。

(5) 被检物不在聚光镜焦点处，进行合轴调整后，圆形光环的中央仍是黑

暗的，这时则要进行调焦。调焦时，上下移动聚光镜，使视野中心呈现一个圆形亮点，其余全黑暗。调节焦点时，要考虑载玻片与盖玻片的厚度，因为暗视野聚光器镜口率较大，焦点较浅，如果过厚，被检标本则无法调在聚光镜焦点处，并且注意载玻片与盖玻片要清洁无损，否则就会因其散射光线而使视野变亮。

(6) 根据聚光器的类型，选用镜口率合适的物镜。

三、用暗视场观察植物细胞结构及胞质环流现象

分别取洋葱鳞片内表面和黑藻叶片，制作水装片，用暗视场观察植物细胞结构及胞质环流现象。

【实验报告】

- (1) 按暗视场光挡法改装出暗视场显微镜。
- (2) 绘图示暗视场内观察到的胞质环流现象。

II. 相差显微镜

【目的要求】

掌握相差显微镜的基本原理及使用，并能利用相差显微镜对活细胞进行形态观察，能辨别出细胞内的细胞核、核仁、线粒体等结构。

【实验原理】

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射率和厚度略有不同，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。因此可用以观察活细胞或未染色标本。

相差显微镜与普通显微镜的主要不同之处是：用环状光阑代替可变光阑，用带相板的物镜（通常标有 PH 的标记）代替普通物镜，并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑，它们的直径和孔宽是与不同的物镜相匹配的。其作用是将直射光所形成的像从一些衍射旁像中分出来。相板安装在物镜的后焦面处，相板装有吸收光线的吸收膜和推迟相位的相位膜。

它除能推迟直射光线或衍射光的相位以外，还有吸收光使亮度发生变化的作用。调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时，聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上，必需调节光阑的亮环和相板的环状圈重合对齐，才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱，应被吸收的光不能吸收，该推迟相位的光波不能推迟，就失去了相差显微镜的作用。人们在显微镜下观察被检物体时，只能靠颜色（光波的波长）和亮度（光波的振幅）的差别看到被检物的结构。活细胞对光线是透明的，光线通过活细胞时，波长和振幅几乎没有改变，所以用普通光镜无法看清未经染色的活细胞。相差显微镜有效的利用了光的衍射和干涉特性，把透过标本可见光的光程差转变成振幅差，提高了各种结构之间的对比度，使标本的各种结构变得更清晰可见，因此它是一种可用来观察未染色的活体标本的细微结构及其变化的显微镜。相差显微镜从光源发出的光透过标本后，发生折射，偏离了未通过标本的光线的光路，这两组光线合轴后，则发生相互干涉现象。透过生物标本发生折射的光线与未透过标本的光线之间产生了光程差。前者被阻滞了 $1/4$ 波长。如果把光程差再增加 $1/4$ 波长，则变为 $1/2$ 波长，合轴后两束光线的干涉加强，使标本周围发生晕圈，提高了可见度。

相差显微镜由相差聚光器和相差接物镜两个主要部分组成。它与普通光镜主要不同之处在于用环状光阑代替可变光阑，用带相板（Phase Plate）的物镜（通常用“ph”标志）代替普通物镜，并带有一个合轴调整的望远镜及滤色片。这些特殊装置能使活细胞或未经染色的标本中各部分的折射率或厚度的微小差异，产生相位差，然后利用光的衍射和干涉的原理，把相差变成振幅差，使人的肉眼能够辨认出来。

【实验用品】

一、仪器与器具

相差显微镜、剪刀、镊子、解剖针、解剖盘、载玻片、吸管、吸水纸。

二、试剂

Ringer 溶液：

氯化钠	0.85g（变温动物用0.65g）
氯化钾	0.25g
氯化钙	0.03g
蒸馏水	100ml

三、材料

草履虫、蛙肝细胞。

【方法与步骤】

（一）相差显微镜的使用

1. 相差显微镜的装置

首先调好相位板，使聚光器相位板号与接物镜放大倍数（相位板）相一致。然后抽出接目镜，再换辅助望远镜，移动辅助镜筒并调整聚光器相位板，使视影像中两个大小一样的光环相互吻合。再重新换上原接目镜，即成相差图像。当更换不同倍数接物镜时，需按上述过程重新调节。

2. 调 光

主要调整照明光的照明度和光轴，令视野照明均匀。首先用低倍镜，并把照明灯虹彩光调至最小，使光落于视野中央；如有偏斜可用聚光器的调整螺丝进行调整。然后打开虹彩使视野内呈均匀照明强度，并使目的物图像达到最大限度反差为止。

3. 调 焦

较高级的相差显微镜视野中间都有双线十字，调焦前先转动目镜使十字的双线清晰，然后再用调焦旋扭调节物镜，使观察物体清晰。在照相目镜上也要采用同样步骤调焦。摄影目镜与观察目镜焦点不一致时，也要根据需要调焦，一般照相时以摄影目镜为主，观察时以观察目镜为主。

4. 合轴调节

拔出目镜，插入中心望远镜，用左手固定其外筒，一边眼看望远镜，一边用右手转动望远镜内筒使其升降，对准焦点后就能看到环状光阑的亮环和相板的黑环。此时可将望远镜固定，微微转动聚光器两侧的调节钮，使两者完全重合。如果亮环和黑环大小不一致，可升降聚光器使之一致，如果升降聚光器仍不能使亮环和黑环一致的话，那就是载、盖玻片过厚的缘故。换用不同物镜要同时更换相对应的环状光阑，并重新合轴。

（二）活细胞的相差显微镜观察

1. 观察草履虫

用滴管吸取含草履虫的溶液将其滴于载玻片上，直接放于相差显微镜下进行观察。

2. 观察蛙肝细胞

(1) 在解剖盘内将青蛙迅速处死，用解剖剪打开腹腔，取出肝组织。

(2) 用剪刀将肝组织剪成小块，用镊子和解剖针，把小块蛙肝组织放在载玻片上，滴加 Ringer 液，分离出游离肝细胞。

(3) 相差显微镜下观察，可见折射率较高的大的球形细胞核，内含折射率更高的小颗粒核仁。在细胞核周围还可见到许多暗白的小颗粒即为线粒体。细

胞质中还有许多大小不等明亮的细胞质颗粒。

【实验报告】

- (1) 简述相差显微镜与普通光学显微镜的差别。
- (2) 图示蛙肝细胞的形态特点。

Ⅲ. 荧光显微镜

【目的要求】

掌握荧光显微镜的结构、原理及其荧光显微术。

【实验用品】

一、仪器与器具

荧光显微镜或普通复式显微镜及荧光装置附件、荧光染料、载玻片、盖玻片、滤纸、被检样品等。

二、材 料

菠菜叶子。

三、试 剂

吖啶橙、95%乙醇、PBS (NaCl 7.2g, Na_2HPO_4 1.48g, KH_2PO_4 0.43g, 加蒸馏水, 定容至1000ml, 调pH值到7.2)。

【实验原理】

荧光显微镜是荧光显微术的基本装置。荧光显微术是利用一定波长的光(通常是波长短的紫外光和蓝紫光)照射被检样品, 激发荧光物质发出可见的荧光。通过物镜和目镜的成像、放大, 以供检视和拍摄。荧光显微镜具特殊光源, 提供足够强度和波长的激发光, 诱发荧光物质发出荧光。视场中所见的像, 主要是样品的荧光映像。

某些物质经波长较短的光线照射后, 分子被激活, 吸收能量后呈激发态。其能量部分转化为热量或用于光化学反应外, 相当一部分则以波长较长的光能形式辐射出来, 这种波长激发光的见光称作荧光。

细胞内大部分物质经短光波照射后, 可发出较弱的自发性荧光。有些细胞成分与能发出荧光的有机化合物——荧光染料结合。激发后呈现一定颜色的荧光, 借以对组织进行细胞化学的观察和研究。

一、荧光显微镜的基本装置及其光路

荧光显微镜因制造厂家、型号的不同，结构各异，但主要构件基本相同。

(一) 光源

采用高压汞灯。汞灯能以最小的表面发出最大数量的紫外光和蓝光，且光亮度大，光度稳定。汞灯的构件，中间为一球形石英玻璃管，有两个钨电极，内充汞滴和少量氩氖混合气体。汞灯装在牢固的灯室中，有调节、聚焦和集光装置。使用中严禁频繁启闭，点亮后欲暂停使用时，不可切断电源，可用光阀阻断光路。当汞灯熄灭后，不能立刻点亮，经 5 ~ 10min 汞灯冷却后再通电点亮。

HBo 200W 汞灯的发射光谱为 200 ~ 600nm，其中在 365nm 和 435nm 处有两个高峰。

(二) 滤色镜系统

荧光显微术的滤色镜，按用途或功能，主要分为下列两类：

1. 激发滤色镜 (Exciter Filter)

激发滤色镜的作用，在于为被检样品的荧光染料提供最佳滤段的激发光。荧光染料均有一定的吸收光谱（激发峰值），利用滤色镜对光线选择吸收的能力，选用其透射光谱，恰为荧光染料的最大吸收光谱（激发高峰）的激发滤色镜，以便从汞灯发出的广谱光波中，选择透过最宜波段的光线使用。

激发滤色镜加放于汞灯和二向色镜 (Dichroic Mirror) 之间，物镜之前。滤色镜的型号不同，数量较多，可按不同需要选用。

2. 阻断滤色镜 (Barrier Filter)

阻断滤色镜位于物镜之上，二向色镜和目镜之间，用以阻断或吸收光路中的激发光或某些波长较短的光线，以防伤害眼睛，使荧光透过。选用的原则，以能完全阻断或吸收波长长于所需荧光的光线，并透过样品发出的荧光。所以，阻断滤色镜的选用，应视荧光染料的荧光光谱而定，以能最大限度地透过荧光和阻断短波光。

荧光显微镜中，除上述两类滤色镜外，尚有一重要的分色镜 (Chromatic Beam Splitter) 系统——二向色镜位于汞灯汞激发滤色镜构成的平行光轴与目镜和物镜构成的竖直光轴的两轴垂直相交处，斜向安装于光路之中。由镀膜的光学玻璃制成，其镜面方位与上述两光轴交角均呈 45°，兼有透射长波光线和反射短波光线的功能。在荧光显微术中承担色光的“分流”作用。

(三) 荧光显微镜的光路

荧光显微镜的光路，因荧光激发的方式不同，可分两种：