

全国高等院校医学实验教学规划教材

组织学与病理学 实验教程

○ 主编 张雅青



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

组织学与病理学实验教程

主 编 张雅青

副主编 甘红云

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书依照国家医师资格考试大纲,结合多年的教学经验,以整合医学实验内容、改进实验方法为手段,融合多媒体教学技术,以提高教学效果为目标,组织编写了《组织学与病理学实验教程》这本实验教材。内容包括:上皮组织,结缔组织,血液,软骨和骨组织,肌组织,神经组织,皮肤,细胞、组织的适应、损伤和修复,局部血液循环障碍,炎症,肿瘤,神经系统及常见疾病,眼和耳,免疫系统及常见疾病,内分泌系统及常见疾病,循环系统及常见疾病,呼吸系统及常见疾病,消化系统及常见疾病,泌尿系统及常见疾病,男性生殖系统及常见疾病,女性生殖系统及常见疾病,传染病与寄生虫病等内容。书中增编了病例讨论、复习思考题、实验须知、正常人体各脏器大小重量、主要器官的结构和生理功能、常用临床化验正常值等内容。

本书采用二维码技术展示切片、标本图片,方便学生学习,适用于高等医学院校本科医学教学,也可作为临床检验工具书、科研参考书。

图书在版编目(CIP)数据

组织学与病理学实验教程 / 张雅青主编. —北京:科学出版社, 2017.8
全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-053666-2

I. ①组… II. ①张… III. ①人体组织学-实验-医学院校-教学参考资料
②病理学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R32-33②R36-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第138082号

责任编辑:朱 华/责任校对:郭瑞芝

责任印制:张欣秀/封面设计:范 唯

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>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017年8月第一次印刷 印张:10 1/2

字数:251 000

定价:39.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

随着我国高等医学教育布局和调整的进行,教学内容和课程体系的改革进入了一个全新的时期。为适应这种形势及卫生事业发展对“卓越医师”培养的需求,我校在临床医学专业实行了一系列的教学改革,结合我校具体的实验条件,将《组织学》与《病理学》两门传统的形态学实验课程整合在一起,即《组织学与病理学》,形成了形态学课程的完整对接和融合。

组织学是研究人体微细结构及其相关功能的科学,其主要是借助显微镜在组织、细胞、亚细胞及分子水平上对人体进行研究。而病理学是研究人体在疾病状态下的系统、器官、组织和细胞的形态学变化,亦即病理变化,其中包括研究病变系统和器官的肉眼病变,即病理解剖学;以及研究病变组织和细胞的镜下病变,即病理组织学。

组织学和病理学是非常注重实践的学科,实验课在总学时中占较大比重,具体内容包括肉眼观察的大体标本、显微镜观察的正常组织和病变组织切片标本、临床 PBL 和 CBL 病例讨论、参观见习尸体解剖,以及观看多媒体图片、录像等。

对于医学生来说,组织学和病理学不仅是重要的医学基础学科,而且是基础医学各学科和临床医学各学科之间的桥梁学科。在临床上,病理组织学检查是疾病诊断的重要手段。在医学研究中,组织学和病理学的形态研究方法更是不可缺少。因此,学好组织学和病理学对于培养合格的新世纪的“卓越医师”,是一个极其重要的环节。

我们依照新的医师资格考试大纲,参考《组织胚胎学实验指导》和《病理学实验指导》内容,结合自编教材《组织学与病理学》,总结提炼多年的教学经验,以整合医学实验内容、改进实验方法为手段,融合多媒体教学技术,以提高教学效果为目标,组织编写了《组织学与病理学实验教程》这本实验教材。本教材将原来组织学的内容和病理学的内容进行了系统-器官的整合,使得形态学知识更加连贯和融合。在教材编写中力求体现三基(基本理论、基本知识、基本技能),三特(特定的对象、特定的要求、特定的限制),五性(思想性、科学性、启发性、先进性、适用性);力求体现内容丰富、层次分明、结构严谨、逻辑性强、文字流畅;增编了病例讨论、复习思考题、实验须知、正常人体各脏器大小重量、主要器官的结构和生理功能、常用临床化验正常值等内容。

课程整合是在西北民族大学的教学指导委员会的指导下开展,作为教学成果。本书也得到了西北民族大学、医学院、教研室各级领导的支持和众多专家的指导和帮助,在此表示衷心的感谢。

本书是西北民族大学“十三五”校级规划教材,适用于临床医学专业的实验教学。

在编写的过程中,编者虽然付出了努力辛劳,仍可能存在疏漏和欠妥之处,请读者和同行专家提出宝贵意见,以促使我们改正和提高。

作 者

2016 年 10 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 学习内容与学习目标	1
第二节 组织学与病理学的实验方法	2
第三节 实验注意事项	13
第二章 上皮组织	15
第三章 结缔组织	19
第四章 血液	23
第五章 软骨和骨组织	27
第六章 肌组织	32
第七章 神经组织	36
第八章 皮肤	41
第九章 细胞、组织的适应、损伤和修复	44
第十章 局部血液循环障碍	50
第十一章 炎症	56
第十二章 肿瘤	62
第十三章 神经系统及常见疾病	69
第十四章 眼和耳	76
第十五章 免疫系统及常见疾病	81
第十六章 内分泌系统及常见疾病	86
第十七章 循环系统及常见疾病	90
第十八章 呼吸系统及常见疾病	100
第十九章 消化系统及常见疾病	108
第二十章 泌尿系统及常见疾病	122
第二十一章 男性生殖系统及常见疾病	129
第二十二章 女性生殖系统及常见疾病	132
第二十三章 传染病与寄生虫病	139
参考文献	146
附录 1 心血管解剖结构及生理功能	147
附录 2 胃肠解剖结构及生理功能	148
附录 3 胰腺和肝脏解剖结构及生理功能	149
附录 4 支气管和肺解剖结构及生理功能	150
附录 5 肾脏解剖结构及生理功能	151
附录 6 子宫、卵巢和乳腺解剖结构 及生理功能	152
附录 7 睾丸解剖结构及生理功能	153
附录 8 淋巴结、脾脏解剖结构及生理功能	154
附录 9 脑和脊髓解剖结构及生理功能	155

附录 10 器官重量	156
附表 10.1 正常器官的重量及大小	156
附表 10.2 各年龄主要器官平均重量表	157
附录 11 常用临床化验参考值及临床意义	158
附表 11.1 血液生化检查	158
附表 11.2 血常规	159
附表 11.3 尿常规	161
附表 11.4 脑脊液、精液、前列腺液检查	162

第一章 绪 论

第一节 学习内容与学习目标

1. 组织学与病理学的内容 主要包括以下三部分:

(1) 人体基本组织以及相关组织病理学的基本内容观察。

(2) 以器官和系统为中心的综合性实验,即以病变的主要器官为中心,强化病变器官从正常到异常以及主要病变器官与其他病变器官之间的横向联系,注重知识的连贯性,形成较为完整的知识体系。

(3) 以尸检病例分析为主的应用性实验,通过临床实际病例,强化基础医学形态知识与临床的纵向联系,注重基础与临床的结合,提高学生观察事物、分析问题和解决问题的能力。

具体的实验内容及学时分配见表 1-1。

表 1-1 实验项目名称和学时分配

序号	实验项目名称	学时分配	实验属性	实验类型
1	上皮组织	3	专业基础	验证性
2	疏松结缔组织、血液	3	专业基础	验证性
3	软骨、骨	3	专业基础	验证性
4	肌组织	3	专业基础	验证性
5	神经组织、皮肤	3	专业基础	验证性
6	细胞和组织的适应与损伤	3	专业基础	验证性
7	损伤的修复、局部血液循环障碍(一)	3	专业基础	验证性
8	局部血液循环障碍	3	专业基础	验证性
9	损伤、修复、局部血液循环障碍(二)、案例讨论	3	专业基础	综合性
10	炎症	3	专业基础	验证性
11	肿瘤(一)	3	专业基础	验证性
12	肿瘤(二)	3	专业基础	验证性
13	炎症、肿瘤案例讨论	3	专业基础	综合性
14	神经系统及其常见疾病、眼与耳	3	专业基础	验证性
15	免疫系统及其常见疾病(一)	3	专业基础	验证性
16	免疫系统及其常见疾病(二)、 内分泌系统及其常见疾病(一)	3	专业基础	验证性
17	内分泌系统及其常见疾病(二)	3	专业基础	验证性
18	心血管系统及其常见疾病(一)	3	专业基础	验证性
19	心血管系统及其常见疾病(二) 呼吸系统及其常见疾病(一)	3	专业基础	验证性
20	呼吸系统及其常见疾病(二)	3	专业基础	验证性
21	免疫、内分泌、神经、心血管及其常见疾病,案例讨论	3	专业基础	综合性
22	消化系统及其常见疾病(一)	3	专业基础	验证性
23	消化系统及其常见疾病(二)	3	专业基础	验证性
24	消化系统及其常见疾病(三)	3	专业基础	验证性

				续表
序号	实验项目名称	学时分配	实验属性	实验类型
25	泌尿系统及其常见疾病	3	专业基础	验证性
26	男性生殖系统及其常见疾病	3	专业基础	验证性
	女性生殖系统及其常见疾病（一）			
27	女性生殖系统及其常见疾病（二）	3	专业基础	验证性
28	传染病、寄生虫病	3	专业基础	验证性
29	消化、泌尿、生殖及传染病，案例讨论	3	专业基础	综合性

2. 本课程的学习目标

- （1）通过对各种组织切片的观察，逐步培养观察、比较、分析和解决问题的能力，培养独立思考和独立工作的能力。
- （2）通过基本技能训练，熟练掌握使用光学显微镜的方法，了解组织和器官切片的一般制作过程，学习在光镜下正确绘图和描述所观察到组织或器官的形态结构特点。
- （3）通过病例分析的实验，回顾和巩固所学的理论知识，在加深对理论课内容理解的同时强化基础和临床的联系，能够掌握从正常结构到病理变化再到临床表现的连贯分析能力，反之从临床表现推断器官的病变，形成对疾病的“动态和有形”认识。

第二节 组织学与病理学的实验方法

一、大体标本观察

各系统不同疾病大体标本的观察方法不同，这里仅介绍一般观察原则。

（一）固定液种类不同，标本颜色不同

实验课所用大体标本取自尸体或临床手术切除的活体标本，需用一定的固定液封存在标本瓶中进行保存。最常用的固定液为福尔马林（10%甲醛溶液、无色透明），固定后组织呈灰白或灰黄色，血液呈灰黑色。有时为保持标本的原有颜色而采用原色固定液，又称天然颜色固定液，如硫酸镁混合液（无色透明），固定后的组织基本保持原有颜色，例如血液或富于血液的组织为红色。

（二）判断所观察标本的类别

运用已学过的解剖学知识，首先辨认标本是什么器官或组织，是哪一侧（有明显解剖学标志能分出左右的器官，如肺脏等），或是该器官组织的哪一部分（如心、脑、肠等的哪一部分）。

（三）判定该标本中有无病理变化（病变）

在确认是何器官组织之后，继而观察有无异常，即是否有病变。为避免遗漏，观察标本时应按一定顺序进行观察和描述。

- 1. 判断器官的大小、重量、形状、颜色、硬度等有无异常 如果标本是器官的一部分，应回忆该器官正常大小（后附正常值），与标本比较，粗略估计标本整体大小。
- 2. 器官表面 包膜是否光滑、增厚或变薄？有无紧张？皱缩？血管弯曲？有无异常物质被覆？有无穿孔？有无隆起、凹陷或变色？有无颗粒或结节？
- 3. 器官切面 先观察实质、颜色有无改变？病灶位置、数量、大小、形状和颜色如何？

表面有无隆起或凹陷?然后观察间质、有无异常物质(如脓液、胆石、寄生虫、栓子等)阻塞管腔?管道有无扩张、扭曲变形?淋巴结是否肿大?

空腔器官自内向外逐一进行检查(自外向内亦可)如心脏的观察顺序是:心腔及内容物(血液)→心内膜及各瓣膜→腱索、乳头肌及肉柱→心肌→心外膜→冠状动脉等。胃肠的观察顺序是:胃肠腔及内容物→黏膜层→黏膜下层→肌层→浆膜层及肠系膜等。

在上述有序观察中,如发现异常之处,要进一步检查,判定是什么病变。

4. 病灶的情况 发现病灶时注意观察病灶数目、大小、形状、颜色、部位、分布、质地、有无包膜及其和周围组织的关系等(不同器官的具体观察方法见各系统的介绍)。

(四) 判定病变性质及其发展阶段

运用所学病理学知识对本标本进行综合分析,一般可按以下三个步骤进行:

1. 实事求是地观察和正确描述标本中病变的形态特点,不要遗漏任何次要病变。

2. 根据观察到的病变形态特点和所学病理知识,初步判定病变可能属于哪一种或哪几种病理过程(血液循环障碍?细胞与组织的损伤?炎症?肿瘤?)。有时应鉴别这种变化是生前发生还是死后出现的变化,如血管及心脏内的血液凝固就需要鉴别是生前血栓还是死后凝血块。

3. 有时标本的形态学改变可能符合两种以上病变,此时可结合其他已知情况(如病史、病因、年龄和性别等)进行鉴别,作出正确诊断。

应当指出,一旦确定是哪种病变,便应进一步运用所学的理论知识确定该病变属于哪个发展阶段,这也非常重要。

(五) 主动训练逻辑思维和推理能力

1. 逻辑联想 在学习、观察一种病变时尽量做到几个联系:

(1) 将片面、静止的标本与病变在人体内发生发展的过程相联系,加深对疾病的认识。

(2) 从大体标本出发,联系切片中会出现什么病理改变,从宏观到微观更扎实、全面地掌握该病变。

(3) 从大体标本的病变出发,主动联系病人会有什么临床表现,为将来学习有关临床课打下良好的基础,这一点尤其重要。

(4) 具有两种以上病变的标本,还应注意分析判断多种病变间有无联系?它们是同一病理过程的病变组合,还是无关的不同疾病?例如有一心脏标本,冠状动脉有粥样硬化和血栓形成,同时还有心肌梗死,这三种病变依次有因果关系;而另一心脏标本冠状动脉有粥样硬化、二尖瓣上有血栓形成,它们之间则无因果关系,是性质不同的两种疾病。

2. 思维导图 判断标本是什么器官→表面→(内或外)→切面→发现一种或多种、一个或多个病灶→病灶间的相互关系→大体所见联系镜下所见并结合理论知识分析本器官病灶与其他器官病灶之间的联系→找出主要病灶→判断什么疾病及病灶在哪个发展阶段→解释临床各种症状→找出死亡的病理依据(如果是死亡案例)。

二、光学显微镜的构造和使用方法

(一) 光学显微镜的原理

光学显微镜(light microscope)又称生物显微镜或光镜,是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的主要部件是物镜和目镜,均为凸透镜。两者放大倍数的乘

积就是显微镜的放大倍数。物镜的焦距短，目镜的焦距较长。物镜到被观察物 AB 的距离稍大于物镜的焦距，通过物镜得到倒立的放大的实像 A'B'。AB 对目镜来说是物体，使 A'B' 位于目镜的焦点以内，这样通过目镜就得到 A'B' 的放大的虚像 A''B''。从图 1-1 上可以看出，A''B'' 的视角比眼睛直接看 AB 时的视角大得多，所以用显微镜可以看清非常微小的物体。

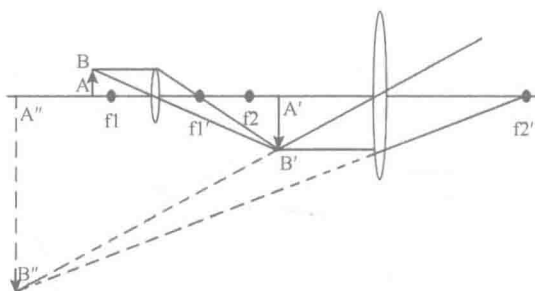


图 1-1 普通显微镜成像光路图

（二）光学显微镜的基本构造及功能（图 1-2）

§1. 显微镜的机械部分

显微镜的机械装置包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗、细调节螺旋等部件。它起着支撑、调节、固定的作用。

1. **镜座** 镜座是显微镜的基本支架，稳定和支持整个镜体。

2. **镜柱** 镜座上面直立的短柱，连接镜座和镜臂。（老式显微镜会有）

3. **镜臂** 镜柱上面的弯曲部分，支持镜筒和载物台，取放显微镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有可活动的倾斜关节，可使镜臂适当倾斜，便于观察；镜筒倾斜式显微镜的镜臂与镜柱连为一体，无倾斜关节。

4. **镜筒** 镜臂前上方的圆筒。镜筒上端安装目镜，下端安装物镜转换器，并且保护成像的光路与亮度。镜筒有单筒式和双筒式，前者又有直立和倾斜式两种，后者均为倾斜式。

从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化，不仅放大倍率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm，此数字标在物镜的外壳上。

5. **物镜转换器** 镜筒下方的圆盘状部件，盘上有 3~4 个圆孔，安装了不同放大倍数的物镜（低倍、高倍、油镜），转动物镜转换器，可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通，与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

6. **载物台** 放置标本片的平台，中央有通光孔，光线通过此孔照射在标本片上，镜台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用为固定或移动标本的位置，使得镜检对象恰好位于视野中心。

7. **推动器** 是移动标本的机械装置，它是由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成的，好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。如果我们须重复观察已检查标本的某一部分，在第一次检查时，可记下纵横标尺的数值，以后按数值移动推动器，就可以找到原来标本的位置。

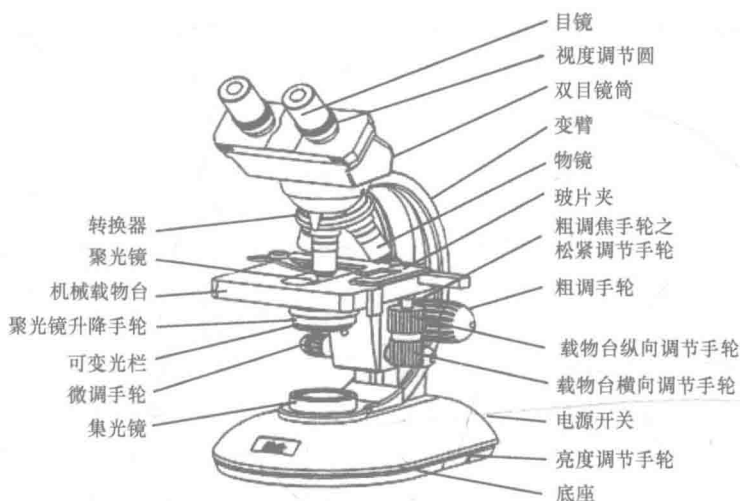


图 1-2 普通光学显微镜

8. 调节器 装在镜臂或镜柱两侧的粗细螺旋，用以调节焦距。

(1) 粗调节器(粗螺旋)：转动时可使载物台(镜筒倾斜式显微镜)或镜筒(镜筒直立式显微镜)大幅度升降，迅速调节物镜和标本间距离使物像出现在视野中。在使用低倍镜时，先用粗调节器找到物像。

(2) 细调节器(细螺旋)：转动时可使镜台或镜筒短距离升降，使用高倍、油镜时或低倍镜下为了得到更清晰的物像时使用。微调螺旋每转一圈镜筒移动 0.1 毫米(100 微米)。新近出产的较高档次的显微镜的粗调螺旋和微调螺旋是共轴的。

9. 眼间距调整 使两目镜与两眼间距离一致，不同的人两眼间距离不同，应根据自己的情况加以调节。

10. 瞳距的调整 使两目镜与两眼间距离一致，不同的人两眼间距离不同，应根据自己的情况加以调节。

§2. 显微镜的照明部分

安装在载物台下方，包括反光镜、聚光器、光圈。

1. 反光镜 较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体，在镜座上装有反光镜。反光镜是由平、凹两面镜组成，可向任意方向转动，将投射在它上面的光线反射到聚光器的中央，照明标本。凹面镜聚光作用强，光线较弱的时候使用；平面镜聚光作用弱，光线较强时使用。电光源普通显微镜没有反光镜，一般在镜座内安装有照明装置，光线的强弱由底座上的光亮调节钮控制。

2. 聚光镜 聚光器在载物台下面，它是由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成的，聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物象获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处，而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm。因此，要求使用的载玻片厚度应在 0.8~1.2mm 之间，否则被检样品不在焦点上，影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有虹彩光圈，它可以开大和缩小，影响着成像的分辨力和反差，若将虹彩光圈开放过大，超过物镜的数值孔径时，便产生光斑；若收缩虹彩光圈过小，分辨力下降，反差增大。因此，在观察时，通过虹彩

光圈的调节再把视场光阑（带有视场光阑的显微镜）开启到视场周缘的外切处，使不在视场内的物体得不到任何光线的照明，以避免散射光的干扰。

§3. 显微镜的光学部分

1. 目镜 安装在镜筒上端，通常备有 2~3 个，上面刻有 5×、10×或 16×符号表示放大倍数，一般用 10×目镜。目镜的作用是将物镜放大的标本像（实像）再放大成虚像。观察者可根据工作需要和标本的实际情况，恰当选择不同放大倍数的目镜。接目镜内常安放一指针，便于指示视野中的某一结构。目镜可旋转，目镜底部有相应的刻度，以供两眼度数不同的人调节。目镜放大倍数过大，反而会影响观察效果。

2. 物镜 安装在物镜转换器上，一般有 3~4 个物镜，分别是 4×、10×、40×（50×）和 100×，在每个接物镜的镜管上分别标有醒目的红色、黄色、蓝色和黑白相间线圈。4×和 10×称低倍镜，40（50）×称高倍镜，100×是油浸镜，从外形上观察不同放大倍数的物镜，可见油镜最长，高倍镜次之，低倍镜最短。通常在物镜上标有主要性能指标—放大倍数和镜口率，如 10/0.25、40/0.65 和 100/1.03，镜筒长度和所要求的载玻片厚度为：160/0.17（mm）（表 1-2）。

表 1-2 不同倍数物镜的比较

物镜	放大倍数	物镜长度	数值孔径	工作距离（mm）
低倍镜	10×	短	0.25	5.40
高倍镜	40×	较长	0.65	0.39
油镜	100×	最长	1.30	0.11

3. 滤光片 在光阑下方有一金属圈，可安放滤光片，借以改变光源的色调和强弱，便于观察和摄影。常用滤光片有三种：①毛玻片——减弱光强度、使光漫射且光度柔和。②蓝玻片——白炽灯光照明时用，将黄色灯光校正成白光。③绿玻片——通常适用。

（三）显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低决定于光学系统的各种条件。被观察的物体必须放大率高，而且清晰，物体放大后，能否呈现清晰的细微结构，首先取决于物镜的性能，其次为目镜和聚光镜的性能。

1. 数值孔径（numerical aperture, NA） 反映该物镜分辨率的大小，数值孔径是物镜和聚光器的主要参数，也是判断它们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系，它与显微镜的分辨力成正比，与焦深成反比，与镜像亮度的平方根成正比。

数值孔径计算方程为： $NA=n \cdot \sin(\alpha/2)$

NA 为数值孔径，n 为物镜与标本之间的介质折射率，α 为物镜的镜口角，折射率大的介质分辨率也大。

几种物质的介质的折射率如下：空气为 1.0，水为 1.33，玻璃为 1.5，甘油为 1.47，香柏油为 1.52。所以镜检时，滴加的香柏油，因香柏油具有与玻璃相似的折光率。所以镜检时，使光源尽可能多的进入物镜中，避免光线通过折射率低的空气（折射率 1.0）而散失光线，因而能提高物镜的分辨力，使物象更加清晰。

2. 分辨率（resolution） 是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力，分辨率与物镜的数值孔径成正比，与光波波长成反比。因此，物镜的数值孔径越大，光波波长越短，

则显微镜的分辨率越大,被检物体的细微结构也越能明晰地区别出来。因此,一个高的分辨率意味着一个小的分辨距离。显微镜的分辨率是用可分辨的最小距离(D)来表示的:

$$D = (\lambda/2) \text{NA}$$

D 为分辨率, λ 为光波波长,可见光的波长为 $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$ (微米),平均波长为 $0.55 \mu\text{m}$ 。若用数值孔为 0.65 的物镜,则 $D = 0.55 \mu\text{m} / 2 \times 0.65 = 0.42 \mu\text{m}$ 。这表示被检物体在 $0.42 \mu\text{m}$ 以上时可被观察到,若小于 $0.42 \mu\text{m}$ 米就不能视见。人的分辨率可达 0.1mm ,显微镜的分辨率能达到 $0.2 \mu\text{m}$ 。

3. 工作距离 指物像调节清楚时物镜下表面与盖玻片上表面之间的距离,工作距离的大小和物镜的放大倍数与数值孔径有关。物镜放大倍数和数值孔径越大,则工作距离越小,反之则越大。一般油镜的工作距离最短,约为 0.2mm 。因此,要求盖玻片的厚度为 $0.17 \sim 0.18 \text{mm}$ 。若盖玻片过厚,就不可能将被检物体聚焦,且易引起物镜的意外损坏。

4. 焦点距离(焦距) 是指平行光线经过单一透镜后集中于一点,由这一点到透镜中心的距离。一个物镜通常是由几个不同性质的透镜组成。因此,它的焦距的测定比较复杂。一般,显微镜的物镜上都注明焦距的长度。物镜的放大倍数越大,焦距越短。

5. 焦点深度 在使用显微镜时,当焦点对准某一物体时,不仅位于该点平面上的各点都可看得清楚,而且在此平面的上下一定厚度内,也能看得清楚,这个清晰部分的厚度就是焦点深度。焦深与总放大率和数值孔径成反比。因此,高放大率和高数值孔径的显微镜其焦深就浅,不能看到标本的全厚度。必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。另外,被检物体周围介质(封片剂)的折射率加大可增大焦深。尤其在显微照相时,更应考虑封片剂的使用。

(四) 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 $3 \sim 6 \text{cm}$ 为宜。

2. 检查显微镜的各个部件是否完整和正常,如果是镜筒直立式光镜,可使镜筒倾斜一定角度以方便观察。但倾斜角度一般不应超过 45° ,否则显微镜重心不稳,易发生倾倒。

3. 使用显微镜观察标本时,要求双眼同时睁开,双手并用。单目显微镜一般用左眼观察,用右眼帮助绘图或做记录;双目显微镜用双眼观察。双手并用一般左手调焦、右手使用推动器移动切片或绘图记录。

4. 左右调整两个目镜之间的距离,使之适合两个眼睛的瞳距。

§2. 低倍镜的使用方法

1. **调光** 打开实验台上的工作灯,转动粗调螺旋,使镜筒略升高(或使载物台下降),调节物镜转换器,使低倍镜转到工作状态(即对准透光孔),当镜头完全到位时,可听到轻微的叩碰声音。

然后打开光圈并使聚光器上升到适当位置(以聚光镜上端透镜平面稍低于载物台平面的高度为宜),双眼同时睁开(既防止眼睛疲劳又便于绘图),用左眼向目镜内观察,同时调节反光镜的方向,使视野内的光线均匀、亮度适中。调光时应注意避免直射光源,以免损坏镜头,并损伤眼睛。

2. **放置玻片标本** 取一张玻片标本,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用标本移动器上的弹簧夹固定好,注意使有盖玻片或标签的一面朝上。然后转动推动器的螺旋,使需要观察的标本部位对准物镜。

3. 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 6mm(注意操作时必须从侧面注视镜头与玻片的距离,以免镜头碰破玻片)。然后用左眼在目镜上观察,同时用左手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,可用推动器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 1cm 还未见到物像,应严格按上述步骤重新操作。

双目显微镜调焦步骤:

(1) 根据观察者的双眼间距调节目镜筒间距:用两只手抓住观察镜面板,调节目镜筒间距,直到通过两目镜筒同时看到完整的视场。眼间距不对,操作时容易感到疲劳,并影响物镜对焦。

(2) 调到适当位置时,注意读出双目间距刻度值,将右目镜筒刻度圈转到与双目间距相同的数值,闭上左眼或用不透明物遮盖左眼,用微调手轮仔细调焦显微镜,直到标本对右眼清晰成像,说明右目镜调好。

(3) 再闭上右眼,不需调焦,旋转左目镜筒刻度圈,直到标本对左眼清晰成像。

(4) 如果双目镜筒间距和刻度圈已调节适合,将得到最佳的效果。调到最佳效果。如需换到另一个物镜时,只要稍微调手轮,即可获得清楚图像。

(5) 为了避免每次使用显微镜都要重复这些调节,应记住各人已调好的各自的刻度值。

§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对准焦距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(盖玻片是否在上)、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,则属高倍镜过长,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,再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对准焦距。

§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物镜移至视野中央。

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. 左眼注视目镜,同时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。操作时不要反方向转动细调螺旋,以免镜头下降压碎标本或损坏镜头。细螺旋原则上不应超过 3 圈。

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可将视野中的指针(装在目镜中的头发丝或细铜丝)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)的钟面,指出有疑问标本位于几点钟的所在位置(如图 1-3)。

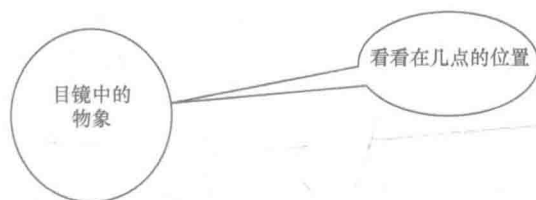


图 1-3 视野中的位置

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 1cm 并将其转离通光孔,直接用擦镜纸顺时针方向擦拭一次,把大部分的油擦掉后,再用沾有少许二甲苯的擦镜纸或脱脂棉球顺时针方向擦一次,最好再用擦镜纸擦一次。玻片标本上的油,如果是有盖玻片的永久制片,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,如此反复几次即可干净。

显微镜使用完毕后,应取下玻片,将标本放回片盒。再将镜头转离通光孔并将镜体擦拭干净,关闭电源,最后罩上防尘罩归位摆整齐。

(五) 使用显微镜应注意的事项

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. 在使用镜筒直立式显微镜时,镜筒倾斜的角度不能超过 45° ,以免重心后移使显微镜倾倒。在观察带有液体的临时装片时,不要使用倾斜关节,以避免由于载物台的倾斜而使液体流到显微镜上。

3. 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。

4. 显微镜的光学部件不可用纱布、手帕、普通纸张或手指揩擦,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。

5. 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。

6. 显微镜使用完后应及时复原。先下降载物台或升高镜筒,取下玻片标本,使物镜转离通光孔,成骑跨状或“八”字形放置。如镜筒、载物台是倾斜的,应恢复直立或水平状态,然后上升载物台或下降镜筒,使物镜与载物台相接近。垂直反光镜,下降聚光器,关小光圈,最后放回镜箱中锁好。

7. 在利用显微镜观察标本时,要养成两眼同时睁开、双手并用(左手操纵调焦螺旋,右手操纵推动器)的习惯,必要时应一边观察一边计数或绘图记录。如果两眼同时睁开观察不习惯,可先用手挡住右眼,等左眼看清视野后逐渐放开右眼,反复练习后便可达到要

求。观察时双眼同时睁开既可防止眼睛疲劳又方便绘图。

三、组织切片的一般制作方法

为了在显微镜下能够看到组织的微细结构，必须把组织切成很薄的薄片，并染色，为此，须将组织器官进行以下处理：

- 1. 固定 将新鲜动物或尸体的组织器官切下一小块，通常置于福尔马林（10%甲醛）液中固定，以保持原来的结构，一般固定 24~40 小时。
- 2. 脱水、透明 用不同浓度的乙醇，按 70%→80%→90%→95%→100%的顺序脱出组织器官中的水分，然后用二甲苯透明。
- 3. 浸蜡、包埋 透明后的组织器官，投入 60℃的溶蜡中浸透，使石蜡完全地透入组织器官内部。然后用包埋器将浸透石蜡的组织器官包于石蜡中，即组织内、外全部由石蜡充满和包裹，使组织器官变硬，利于切成薄片。
- 4. 切片、黏片 将上述蜡块用切片机切成 3~10μm 薄片，置于温水展开，贴于涂有蛋清甘油的载玻片上，放入 37℃温箱烘干。
- 5. 脱蜡、染色 将上述载有蜡片的玻片放入二甲苯中，至石蜡全部溶解后经 100%→95%→90%→80%→70%不同浓度的酒精脱去二甲苯，并由水取代酒精，再染色，最常用的是苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin staining），简称 HE 染色法。染色结果：苏木精为碱性染液，主要使细胞核内的染色质与胞质内的核糖体着紫蓝色。伊红为酸性染料，主要使细胞质和细胞外基质中的成分着粉红色。易于被碱性或酸性染料着色的性质分别称为嗜碱性和嗜酸性。除 HE 染色法外，还有许多染色方法，分别用以显示不同的结构（表 1-3）。

表 1-3 几种主要染色法的染色特点

名称	用途和结果
HE 染色法（苏木精-伊红染色法）	最普通染色：胞核呈紫蓝色，胞质呈粉红色，结缔组织中胶原、弹性纤维呈粉红色
PAS 染色法（过碘酸雪夫反应）	显示多糖类，如：糖原、黏多糖、黏蛋白、糖蛋白，呈红色或紫红色
镀银染色法	显示单层扁平上皮的界限，呈棕黑色
Wright（瑞特）染色法	末梢血片，骨髓片最常用的染色法
Foot 染色法	显示网状纤维，呈黑色
Mallory 染色法	各种结缔组织被染成不同程度的蓝色，细胞核、细胞质、神经纤维均被染成红色
COX 染色法	显示神经元，神经胶质细胞的胞体、突起，呈黑色
Masson 染色法	显示胶原纤维，呈蓝色或绿色

6. 脱水、封固 又经 70%→80%→90%→95%→100%不同浓度的酒精，脱去染色过程中的水分，再经二甲苯透明加上树胶，盖上盖玻片，宜于长期保存和观察。

四、电子显微镜基本原理及超薄切片标本的制作过程

（一）透射电子显微镜（transmission electron microscopy，TEM）

电镜是研究细胞组织和器官的超微结构的基本工具，所以在电镜下拍摄的照片是我们用作研究的主要材料。

电镜是一个筒管状装置，其结构和成像的原理与普通光学显微镜基本相同，但有以下

几点主要区别:

1. TEM 用电子束代替光镜用的可见光作光源。
2. 用一组电磁透镜代替光镜的一组玻璃透镜, 用来聚焦和放大标本。
3. 为避免电子束与空气分子碰撞而引起散射, 电子束要求高度真空。
4. 肉眼不能直接看见标本的电子放大图像, 必须将其投射到荧光屏上才能观察。
5. TEM 用的标本是用特殊玻璃刀在超薄切片机上切成的 50~80nm 厚的超薄切片, 裱在小铜网上, 用重金属盐进行电子染色后放在电子束途中进行观察。
6. 优良的 TEM, 分辨率很高, 可达 0.6nm 左右, 比普通光镜分辨率大 1000 倍以上。光镜能放大一千倍, 而 TEM 能放大几十万倍。

(二) TEM 标本的制作过程

TEM 所观察的超薄切片比石蜡切片薄得多。但制作原理却基本相同。制作过程也经过取材、固定、脱水、包埋、切片和染色等步骤。现将其特殊之处介绍如下:

1. 取材 TEM 标本取材要求速度快, 一般在动物杀死后一分钟内将组织块取下浸入固定液。组织块大小一般不超过 1mm^3 。取材操作应细致, 避免任何牵、拉、挤、压造成的损伤。
2. 固定 分预固定和后固定两步。均在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下进行。
3. 预固定 常用 2%~4%戊二醛和多聚甲醛固定液, 常用 0.1M 磷酸缓冲液配制, pH7.4。
4. 后固定 1% 四氧化锇 (OsO_4), 常用磷酸缓冲液配制, pH7.4。
5. 脱水 常用各种浓度的乙醇或丙酮彻底脱水。
6. 浸泡 常在脱水后, 用丙酮做中间溶剂, 溶解包埋剂、浸泡组织, 逐渐向组织中引入包埋剂。
7. 包埋 用环氧树脂包埋组织块, 借其聚合作用, 使之变得十分坚硬, 便于切成超薄片。
8. 切片 用特殊锐利的玻璃刀或金刚钻刀, 在超薄切片机上将组织切成 50~80nm 的超薄切片, 裱在小铜网上。
9. 染色 用醋酸铀和枸橼酸铅双染色。

电镜观察不是依据标本颜色分辨结构, 而是根据细胞和组织结构染色后对电子散射的程度 (或叫电子密度) 显示出不同的结构图像。用醋酸铀和枸橼酸铅染色, 是重金属沉淀在一定部分上, 增加其散射电子的能力, 使该部分电子密度增大, 因此, 图像呈现为深暗色。而电子密度小的结构部分容许大部分电子束透过, 因而图像呈现为明亮色, 这种电子密度大小的差别叫反差。便于观察, 所以又叫电子染色。染色后的小铜网可放入电镜中观察, 观察中拍照, 冲洗胶卷, 印成照片供学习研究用。

(三) 扫描电子显微镜 (SEM)

扫描电子显微镜主要是观察细胞组织和器官的表面形态的一种电镜, 它的成像是由于电子枪发射出电子束, 经过透镜的会聚, 聚焦成一电子束, 此电子束打到标本上, 在沿着整个样品表面移动进行扫描时, 就会产生代替整个表面形态的二次电子信号。用电子检波器接收, 放大这些信号。SEM 照片图像赋予立体感、真实。将 SEM 照片和 TEM 照片结合起来, 能使我们获得组织, 细胞和器官的完整的超微结构知识。