



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

医学细胞生物学实验

第2版

◎ 主编 孙 媛 程晓馨



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

医学细胞生物学实验

第2版

主 编 孙 媛 程晓馨

主 审 刘 佳

副主编 王 茜 马景昕 张 朋

编 委 (按姓氏笔画排序)

马景昕 (大连医科大学)

王 婷 (南京医科大学)

孔庆友 (大连医科大学)

刘彦娜 (大连医科大学)

刘 铭 (大连医科大学)

李 宏 (大连医科大学)

张开立 (大连医科大学)

罗 阳 (中国医科大学)

王 茜 (大连医科大学)

王 韵 (陆军军医大学)

刘 佳 (大连医科大学)

刘晓宇 (大连医科大学)

孙 媛 (大连医科大学)

吴茉莉 (大连医科大学)

张 朋 (大连医科大学)

程晓馨 (大连医科大学)

科学出版社

内 容 简 介

医学细胞生物学的理论和技术是医学科学知识结构的重要组成部分。本教材涵盖了细胞生物学常用实验技术中与基础和临床医学关系密切的内容,设基本实验和综合实验上下两篇。上篇为基本实验,对每个基本实验的目的、基本原理、操作流程和实验结果作了比较详细的介绍;而下篇则根据学科的进展和未来发展趋势,结合自身的教学和科研体验,归纳出可操作性较强,体现出学科间交叉渗透特点的综合实验。因此,本教材既可以作为学生的教科书,也能成为他们日后的实验参考书。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学实验 / 孙媛, 程晓馨主编. —2 版. —北京: 科学出版社, 2018.1

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-056331-6

I. ①医… II. ①孙… ②程… III. ①医学-细胞生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 008884 号

责任编辑: 王 颖 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

天津翔远印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 1 月第 二 版 印张: 13

2018 年 1 月第五次印刷 字数: 355 000

定价: 45.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

医学科学的发展离不开生命科学相关领域的不断进步,而作为生命科学前沿学科的细胞生物学无疑对现代医学起重要的推动作用。诸如干细胞的分离、分化诱导与应用,新药的开发和疗效鉴定,癌症的分子诊断与生物治疗,以及疾病的个体化治疗等生物医学的热点问题,无一例外地得益于细胞生物学的理论和技术的支撑,并成为转化医学的重要组成部分。与医学十分类似,细胞生物学是实践性和实验性很强的学科,其理论和学说都建立在实验室的研究结果之上。

由于细胞生物学技术发展迅速,而且与基础和临床医学的关系十分密切,熟悉和掌握常用的医学细胞生物学技术是医学生所应具备的基本技能和自身素质的体现,也能使他们在未来的医学工作生涯中获益匪浅。基于上述考虑,本教程选择了一些与基础和临床医学密切相关的细胞生物学实验内容。

鉴于本书是医学生专业基础课实验教材,同时也考虑到可以作为研究生、教师与科研人员及其他学科工作人员的参考书,因此本书在考虑教材所要求的基础性与系统性的同时,还考虑到其内容的先进性和知识结构的合理性。编写人员在多年教学实践经验的基础上,根据近年来细胞生物学研究的进展和人才培养的需求,对教材的结构体系和教学内容作了较认真的思考和探讨。

教程设基本实验和综合实验上下两篇。上篇为基本实验,介绍了每个实验的目的、基本原理、操作流程和实验结果;下篇则根据学科的进展和未来发展趋势,结合自身的教学和科研体验,归纳出可操作性较强,体现出学科间交叉渗透特点的综合实验;最后配有介绍基本知识的附录。这样一来,学生们不但可以把本教程作为教材使用,还能当作日后的实验参考书,可谓一书多用。一本实验教程除具备先进性和适用性外,还要做到精益求精。尽管编写组成员为达到上述目标尽了最大努力,但因专业能力和编写时间有限,书中难免出现问题,请用书的师生们给予批评指正。编写的过程中,得到科学出版社的支持和配合,在此表示感谢。

主 编

2017年12月

目 录

上篇 基本实验

第一章 显微镜的构造和使用	1
实验 1-1 普通光学显微镜的构造、使用方法及细胞基本形态结构的观察	1
实验 1-2 倒置相差显微镜的构造与使用	5
实验 1-3 显微镜测微尺的使用	8
第二章 流式细胞仪技术与应用	14
实验 2-1 流式细胞仪结构原理及应用	14
实验 2-2 流式细胞仪检测细胞周期	18
实验 2-3 流式细胞仪检测细胞凋亡	19
实验 2-4 流式细胞仪检测细胞中抗原——流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群	21
第三章 细胞器结构的观察与分离	24
实验 3-1 细胞器结构的观察	24
实验 3-2 细胞器分级分离	31
第四章 细胞化学方法和细胞化学成分显示	34
实验 4-1 细胞化学基本理论	34
实验 4-2 细胞中骨架蛋白的显示与细胞形态的观察	37
实验 4-3 Feulgen 法显示脱氧核糖核酸	39
实验 4-4 甲基绿-派洛宁显示核酸	41
实验 4-5 苏木素-伊红染色显示细胞核和细胞质	42
第五章 酶细胞化学	45
实验 5-1 酶细胞化学的基本原理	45
实验 5-2 碱性磷酸酶显示及用途	47
实验 5-3 联苯胺法显示过氧化物酶及应用	49
实验 5-4 詹纳斯绿显示活体细胞线粒体	50
实验 5-5 利用琥珀酸脱氢酶活性进行 MTT 检测细胞相对存活率	51
实验 5-6 CCK8 检测技术	53
第六章 免疫化学技术	56
实验 6-1 免疫酶细胞化学法检测髓母细胞瘤细胞系中 P65 蛋白的表达	56
实验 6-2 免疫荧光染色显示髓母细胞瘤细胞系中 HES1 蛋白的分布	58
实验 6-3 免疫组织化学法检测 HES1 在胃癌组织中的表达与分布	60
第七章 细胞遗传学技术	64
实验 7-1 人类性染色质标本的制备与观察	64
实验 7-2 人外周血淋巴细胞培养与染色体制备	66

实验 7-3 小鼠骨髓细胞染色体标本的制备与观察	69
实验 7-4 染色体 G 显带技术	70
实验 7-5 核型分析	74
第八章 细胞培养技术	77
实验 8-1 细胞培养的基本原理与技术	77
实验 8-2 细胞的原代培养	84
实验 8-3 传代细胞培养	85
实验 8-4 培养细胞的形态观察和计数	87
实验 8-5 细胞冻存、复苏与运输	90
实验 8-6 细胞克隆化培养	92
实验 8-7 细胞三维培养	94
第九章 细胞行为学	99
实验 9-1 细胞吞噬实验	99
实验 9-2 细胞融合实验	101
实验 9-3 细胞周期	106
实验 9-4 小鼠减数分裂	109
实验 9-5 细胞周期特定时相细胞同步化方法	113
实验 9-6 细胞运动的观察	116
实验 9-7 肿瘤细胞的迁移和侵袭试验——Transwell 小室测定法	118
第十章 细胞衰老和凋亡的检测	120
实验 10-1 苏木素-伊红染色法显示凋亡细胞	120
实验 10-2 Giemsa 染色法显示凋亡细胞	122
实验 10-3 凋亡细胞的原位末端转移酶标记法 (TUNEL 法)	123
实验 10-4 细胞凋亡的琼脂糖凝胶电泳检测	125
实验 10-5 细胞衰老的检测	127
第十一章 蛋白质的分离与测定	129
实验 11-1 真核细胞蛋白质提取	129
实验 11-2 双缩脲法测定蛋白质浓度	131
实验 11-3 福林-酚法测定蛋白质浓度	132
实验 11-4 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度	134
实验 11-5 蛋白质印迹免疫分析 (Western blot)	135
第十二章 核酸的分离、测定与分析	139
实验 12-1 真核生物组织及细胞基因组 DNA 提取	139
实验 12-2 组织及细胞中 RNA 的提取	140
实验 12-3 DNA 与 RNA 含量测定	142
实验 12-4 聚合酶链反应技术 (PCR) 体外扩增 DNA 片段	143

实验 12-5 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	145
实验 12-6 实时定量 PCR (Real time-PCR)	148

下篇 综合实验

第十三章 小鼠胚胎干细胞培养	152
实验 13-1 小鼠胚胎成纤维细胞的培养	152
实验 13-2 饲养层细胞的制备	154
实验 13-3 小鼠胚胎干细胞的分离及培养	155
第十四章 IL-6 剥夺诱导小鼠 B 细胞杂交瘤细胞系 7TD1 细胞凋亡、观察及检测	157
实验 14-1 小鼠 B 细胞杂交瘤细胞系 7TD1 细胞复苏与传代培养	158
实验 14-2 7TD1 细胞的凋亡诱导 (IL-6 剥夺) 及细胞收集	160
实验 14-3 IL-6 剥夺诱导 7TD1 细胞凋亡的形态特征观察	161
实验 14-4 IL-6 剥夺诱导 7TD1 细胞凋亡的 DNA 提取及凋亡梯状带检测	164
第十五章 观察白藜芦醇对髓母细胞瘤细胞分化、运动、凋亡的影响及相关基因的检测	168
实验 15-1 细胞的培养与传代	168
实验 15-2 白藜芦醇处理前后细胞数量和形态的观察以及免疫细胞化学染色	170
实验 15-3 白藜芦醇对髓母细胞瘤细胞迁移能力的影响	172
实验 15-4 总 RNA 提取和分化相关基因突触素 (synaptophysin) 的 RT-PCR 检测	173
第十六章 小鼠表皮细胞原代培养及免疫荧光检测	175
实验 16-1 细胞原代培养 (消化法)	175
实验 16-2 细胞传代	176
实验 16-3 细胞的处理及免疫荧光法检测 E-cadherin	177
实验 16-4 细胞的显微摄影	179
第十七章 应用基因重组技术在真核细胞中表达和检测 p53 基因	182
实验 17-1 目的基因 p53 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测	183
实验 17-2 目的基因 p53 片段纯化回收与重组表达载体连接、转化、筛选及重组质粒提取	184
实验 17-3 培养细胞转染目的基因表达载体	187
实验 17-4 Western blot 方法检测外源目的基因 p53 表达	188
附录	191
附录一 试剂浓度的表示方法及其计算	191
附录二 常用人工合成细胞培养基的种类、化学组成及适用细胞	193
附录三 实验室常用细胞系 (株)	196
附录四 离心机转数与离心力的换算表	199

上篇 基本实验

第一章 显微镜的构造和使用

【相关背景】

显微镜是 20 世纪最伟大的发明物之一。通过显微镜，人们观察到一个全新的微观世界。显微镜是用来观察、记录和研究经过制片技术处理后被检物体细微结构的最主要的光学精密仪器，在细胞生物学领域中应用最为广泛。这对微观世界的探索及理论的研究起着极其重要的作用。用于普通光学显微镜观察的生物样品必须经过一系列的组织处理并制成 $1\sim 10\mu\text{m}$ 的切片，并经过特定的染色才可用于观察研究。普通光学显微镜可以观察染色的生物标本的结构，主要是因为光线通过染色标本时其颜色（光波的波长）和亮度（光波的振幅）发生变化，人的眼睛才能观察到。

近年来，随着多种现代生物学技术与光镜技术的结合，使光学显微镜展示出更新的活力。目前光学显微镜已发展成多种类型，用于各类不同的研究目的。在细胞生物学中常用的有普通光学显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、相差显微镜以及暗视野显微镜和微干涉差显微镜。

实验 1-1 普通光学显微镜的构造、使用方法及细胞基本形态结构的观察

【实验目的】

1. 掌握低倍镜和高倍镜的使用方法，初步学会油镜的使用。
2. 掌握临时制片和生物绘图方法。
3. 熟悉光学显微镜下细胞的基本形态结构。
4. 熟悉普通光学显微镜的主要构造。

【实验原理】

光学显微镜是用于观察微小生物及细胞结构的常用仪器。它利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，将两个正透镜恰当地调节组合，放大标本，以供观察。光镜的最大分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ 。

【实验准备】

1. 实验对象 头发交叉装片，字母装片，口腔黏膜上皮细胞，西红柿。
2. 实验试剂 0.9%生理盐水，0.1%亚甲基蓝，蒸馏水，二甲苯，香柏油。
3. 实验器材及仪器 普通光学显微镜，载玻片，盖玻片，镊子，消毒牙签，烧杯，吸管，吸水纸，擦镜纸，纱布，镜油瓶或二室瓶。

【实验内容与方法】

1. 普通光学显微镜的构造及使用 普通光学显微镜（简称光镜）是最常使用的显微镜，主要由三部分组成：聚光镜、物镜和目镜（图 1-1）。光镜采用可见光作光源，分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ，放大

倍率为 1000 倍，其他几种显微镜都是在此基础上发展起来的。

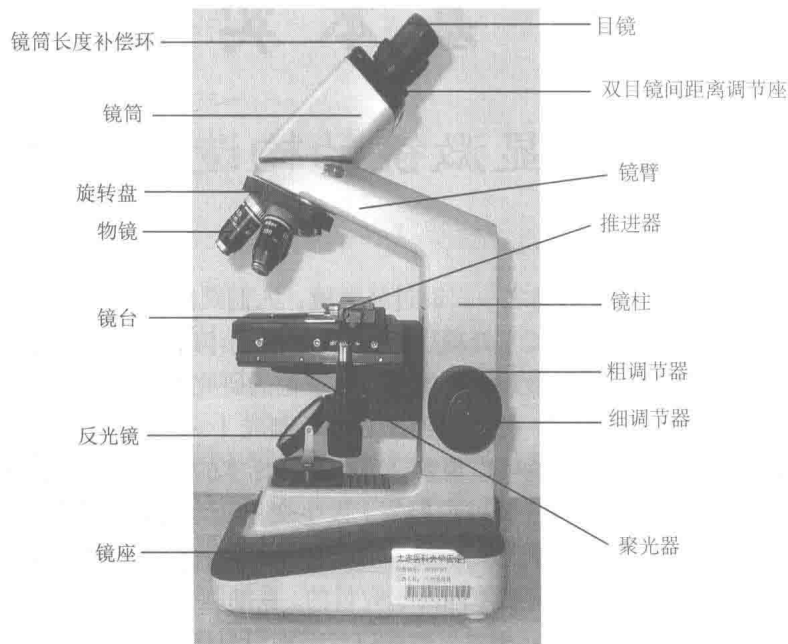


图 1-1 双目镜筒显微镜结构

(1) 机械部分

- 1) 镜座：是显微镜的基座，位于最底部。呈长方形或马蹄形，用以支持镜体和稳固显微镜。在镜座上固定有照明部分的反光镜或电光源。
- 2) 镜柱：是镜座上方垂直的柱形粗大部分，上端与弯曲的镜臂相连。在其两侧有突出圆形螺旋，为对焦粗调节器和细调节器。
- 3) 镜臂：紧接镜柱顶部并向前弯曲，上端与镜筒相连，也是取用显微镜时手握之处。
- 4) 镜筒：是连于镜臂前端或上方的结构，呈圆筒状或矩形，顶部装有目镜（一个或两个）。
- 5) 镜台（载物台）：与镜柱相连，为一块方形（或圆形）平板，用以放置玻片标本。镜台中央有一圆形通光孔，由反光镜反射来的光线经此孔射向标本。镜台上有一可动的弧形弹簧夹，用以固定玻片标本。
- 6) 推进器：位于镜台后部。在镜台左下方有上下两个同轴螺旋，转动时，可使推进器前后或左右移动。

位于推进器后方与侧面上有纵横游标尺（图 1-2），用以测量标本在视野中的位置和长度。它由主标尺 m 和副标尺 n 组成。主标尺刻有一毫米的分度；副标尺刻有 9/10mm 的分度，读数为 0.1mm。使用时首先看副标尺“0”的位置，然后看与主标尺相重叠的一致点，如图 1-2 所示，副标尺“0”的位置在 12mm 与 13mm 之间，而副标尺的 8 与主标尺的 20 完全重合在一起，则得知读数为 12.8mm。

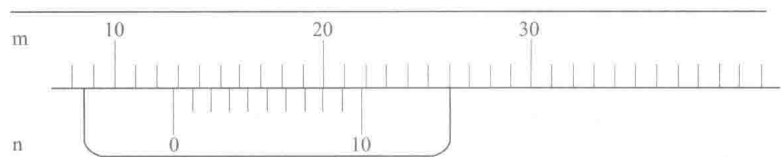


图 1-2 纵横游标尺

7) 调节器: 是装在镜柱上的大小两种螺旋, 转动时可使镜台上下移动, 以调节物镜和标本之间的距离, 即调节焦距。

转动粗调节器时镜台升降幅度较大, 能迅速调节物镜与标本间的距离, 使物像呈现于视野中。

转动细调节器时镜台升降幅度小, 一般在用粗调节器调焦的基础上或在使用高倍镜时, 用它作比较精确的调节, 从而得到完全清晰的物像, 并能观察标本不同层次和不同深度的结构。在细调节器上有刻度, 用以测量被观察物体的厚度, 在 OLYMPUS-CHC 型显微镜的细调节器上有 180 个刻度, 一刻度为 $2.5\mu\text{m}$ 。

在左侧粗调节器与镜柱之间有一窄环, 称为松紧调节环, 可控制调节器的松紧 (松紧已调好, 勿动)。

在右侧粗调节器与镜柱之间有一具小柄的窄环, 此柄为粗调限位柄, 可使粗调节器限定镜台只能在一定范围内升降, 此环已锁好, 初学者勿动。

8) 旋转盘 (物镜转换器): 连于镜筒下端, 为一凸形圆盘, 可以自由转动, 其下方有 3~4 个螺旋口, 可按顺序装上不同放大倍数的物镜。当物镜转到工作位时 (即与光轴合轴), 即发出 “咔” 的声音, 否则无法观察标本 (初学者勿随意拆卸物镜)。

(2) 照明部分: 在镜台下方装有一套照明装置, 由反光镜或电光源、聚光器、光阑组成。

1) 反光镜: 是装在镜座上的小圆镜。有平、凹两面, 可向任意方向转动。用以把光源的光线反射入聚光器中, 再经过通光孔照明标本。反光镜的凹面镜聚光力强, 适于光线较弱时使用, 在光线较强时, 宜选用平面镜。

2) 聚光器: 位于镜台下方, 由一组透镜组成, 可将光线汇集成束, 以增强照明作用。会聚后的光线经通光孔射至标本上。在聚光镜的侧下方 (右或左侧) 有一小螺旋, 转动时可升降聚光器。上升时, 光线增强; 下降时则光线减弱。

3) 光阑 (光圈): 位于聚光器下方, 由一组金属薄片组成。其侧面有一小黑柄, 移动时可使光阑开闭。当光阑开大, 则光线较强, 适于观察色深标本; 光阑缩小, 则光线较弱, 适于观察透明 (或无色) 的标本。

光源: 可以是天然光源或人工光源, 随情况而定。

(3) 光学部分: 由物镜和目镜组成。

1) 物镜: 是决定显微镜质量、分辨力和放大倍数最关键的光学部分。物镜镜筒上刻有主要性能参数, 按放大倍数不同, 分述如下:

2) 低倍镜: 镜筒最短, 镜面直径最大。筒上刻有 10 或 $10\times$ 字样, 即放大 10 倍。另刻有 0.25 字样为数值孔径 (简称为 N.A.), 可反映该物镜的分辨力之大小, 数值愈大, 表示分辨力愈高。

3) 高倍镜: 镜筒较低倍镜镜筒长, 镜面直径较小。筒上刻有 40 或 $40\times$ 字样, 即放大 40 倍。尚刻有 0.65 及 0.17 字样, 分别表示其 N.A. 及物镜要求的盖玻片厚度。

4) 油浸镜: 镜筒最长, 镜面直径最小。筒上刻有 100 或 $100\times$ 字样, 即放大 100 倍。尚刻有 HL 表示油浸镜; 1.30 为 N.A. 值。

5) 目镜: 是仅次于物镜的光学部件, 它将物镜放大形成的中间像进一步放大, 便于观察, 但它并不能提高显微镜的分辨力。目镜位于镜筒上端, 可装有一个目镜 (单目镜筒) 或两个目镜 (双目镜筒), 其上刻有 $10\times$ 或 $15\times$ 等字样, 表示其放大倍数。目镜通常由两个透镜组成, 上面与眼接触的为接目透镜; 下面的叫视野透镜 (在镜筒内, 可不观察)。

显微镜的总放大倍数的计算是目镜放大倍数与物镜放大倍数之积。如目镜为 $10\times$, 物镜为 40, 则物体放大倍数为 400 倍。

2. 显微镜的使用方法

(1) 低倍镜的使用

1) 显微镜的拿取与安放: 使用时, 打开镜箱, 右手握住镜臂, 左手托住镜座, 保持平稳状态轻轻放在实验台上。如使用的为双目镜筒的显微镜应放在观察者的正前方; 如使用的为单目镜筒的显微镜时, 应放在观察者的左前方。显微镜距桌缘约 3~6cm。调节凳子的高度, 使眼与目镜接近, 以便观察并保持姿势端正。

2) 对光: 转动旋转盘, 使低倍镜对准镜台上的通光孔, 当听到“咔”的轻微碰击声时, 说明目镜与物镜的光轴一致。打开光阑, 上升聚光器, 两眼睁开, 经目镜观察, 转动反光镜, 使它朝向光源, 直至目镜中所见视野范围内的光线均匀, 亮度适宜为止。

3) 置片: 取头发或字母制片, 使有盖片的一面朝上, 放在镜台上, 用弹簧夹夹住(无盖片的标本应使有材料的一面朝上)。然后用左手转动推动器螺旋, 将标本移至通光孔中央。

4) 调焦: 俯首侧视低倍镜, 转动粗调节器使镜台上升至距标本 0.5cm 处, 根据显微镜类型选取下述方法继续操作:

使用单目镜筒: 用左眼从目镜中观察视野, 同时右眼要张开。再慢慢转动粗调节器, 使镜台慢慢下降, 直到视野中观察物象清晰为止。

使用双目镜筒: 首先调节双目镜间的距离, 使与观察者的瞳距一致。调节时分别用双手的拇、食指把住目镜下黑色横板(双目镜筒间调节座)的边缘, 向外拉或向内推, 此时双眼在两目镜上观察, 直至看到一个大而明亮的视野为止, 读出目镜筒间距数值。然后, 旋转右镜筒长度补偿环的刻度值, 使与双目镜筒间距数值一致并对准环下外侧的白色刻度线。再转动粗调节器, 使镜台慢慢下降, 直到右眼所观察的物象清晰。随后再旋转左镜筒长度补偿环, 至物象清晰为止。通过以上操作, 左右目镜的焦点已对好, 此镜筒长就能保持物镜的放大倍数和同等焦距正确, 并调节双目镜筒的距离和补偿观察者两眼的视度差。在操作时必须养成两眼张开, 两手并用(右手操作调节器, 左手操纵推进器)的习惯。

(2) 高倍镜的使用: 先从低倍镜下看清物象(如字母或头发的交叉点)并移到视野中央, 然后可直接换用高倍镜观察。转换高倍镜时速度要慢, 并从侧面观察, 防止高倍镜碰撞玻片! 转换好高倍镜后, 从目镜观察, 慢慢转动细调节器(切勿用粗调节器, 以防压碎玻片、损坏镜头), 直至物象清晰为止。观察时如光线较弱, 可调节聚光器等, 使光线适宜。如在视野内找不到物像, 说明观察的目的物不在视野中央, 或焦距不对, 必须从低倍镜开始按上述过程重新操作。

(3) 油浸镜的使用: 把在高倍镜下观察的目的物, 移至视野中央后, 移开高倍镜, 在盖玻片上滴一滴香柏油, 换用油浸镜并使镜头浸在“油”中。观察时, 只需略微转动细调节器, 就能看清物像。

观察完毕后, 转动粗调节器, 使镜台下降, 取下制片, 在一块擦镜纸上滴加二甲苯, 擦净镜头上的香柏油, 再另换一块干净擦镜纸再揩擦一次。制片也按上法擦净。

3. 细胞形态结构的观察

(1) 制作并观察人的口腔上皮细胞的临时装片

1) 在洁净的载玻片中央, 滴一滴生理盐水。

2) 用消毒牙签的一端, 在漱净的口腔侧壁上轻轻地刮几下。

3) 把牙签上附有碎屑的一端, 放在载玻片上的生理盐水滴中涂匀。

4) 用镊子夹起洁净的盖玻片, 将它的一边先接触载玻片上的生理盐水滴, 然后, 轻轻地盖在水滴上。然后在盖片的一侧加一滴 0.1% 亚甲基蓝染液, 在盖片的另一侧用吸水纸吸取, 染色后细胞核被染成深蓝色, 细胞质浅蓝色。

5) 用显微镜观察细胞形状, 细胞呈扁平鳞状。

(2) 西红柿果肉细胞涂片制作: 西红柿果肉细胞涂片似人口腔上皮细胞, 但将生理盐水换成蒸馏水, 且不必染色就可直接观察。注意植物细胞的大小和形态与动物细胞的不同。

【注意事项与常见问题】

显微镜是贵重精密仪器, 要做到正确而熟练地使用, 应注意如下事项:

1. 操作时注意事项

(1) 在放置玻片标本时, 应特别注意有盖片的一面朝上, 切勿反放。反放对观察低倍镜影响不大, 但当换用高倍镜或油浸镜时, 不但在视野内找不到物像, 而且易损坏物镜上的透镜及标本。

(2) 在使用双目镜筒观察时, 首先要调好双目镜间距与瞳间距一致, 并调好镜筒长度补偿环的数值刻度。

(3) 观察任何标本时, 应先用低倍镜。如果用高倍镜观察, 也要先在低倍镜下找到物像, 并将所要详细观察的部分移到低倍镜视野中央, 然后再转换高倍镜。如果要用油浸镜, 也要先用低倍镜, 然后用高倍镜, 最后使用油浸镜。

(4) 用低倍镜观察色深的标本适于用较强的光线; 观察透明(或无色)的标本, 适于用较弱的光线。

(5) 观察时要两眼同时张开, 两手并用。

2. 显微镜的维护

(1) 按要求拿取显微镜, 切勿单手提着行走, 以免碰坏或使部件跌落。

(2) 用前要检查, 发现问题, 立即报告老师。

(3) 不得随意拆卸任何部件和转动已闭锁好的结构。

(4) 光学部分和照明部分要用擦镜纸揩擦, 不得手摸或用它物揩擦; 机械部分用纱布揩擦。

(5) 不得将临时制片的水、化学试剂和药品沾污镜头和镜台。

(6) 当离开座位(观察示教镜或进行其他操作)时, 要下降镜台, 旋转物镜使之离开通光孔, 并使三个物镜均朝向前方。

(7) 使用完毕, 应下降镜台, 取下玻片标本, 旋开物镜(同离开座位时相同), 再使镜台上升, 最后填写使用登记本, 把显微镜放回原处。

【作业与思考题】

1. 绘出你所观察到的人口腔上皮细胞和西红柿果肉细胞图, 指出各部分的名称。

2. 为什么在用高倍镜或油浸镜时, 必须从低倍镜开始观察? 并把目的物移至视野中央?

附: 试剂配制

1. 0.9%的生理盐水 氯化钠 9g, 纯水适量, 先用纯水少量溶解, 然后再加水至 1000ml。即配制成每 100ml 溶液中含 0.9g 氯化钠的生理盐水。

2. 0.1%亚甲基蓝染液 0.1g 亚甲基蓝溶入 100ml 蒸馏水即可。

实验 1-2 倒置相差显微镜的构造与使用

【相关背景】

相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差(即相位差)转化为光强差的特种显微镜。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(相位发生的差异即相差),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。相差显微镜成像原理即当同一种光通过细胞时,由于细胞不同部分对光的折射率不同,因此,通过细胞的光线和未通过细胞的光线便可以产生相位差。再通过特定的相差板使之发生干涉,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。倒置相差显微镜,其照明系统位于镜体上方,而物镜和目镜则位于下部。这样在集光器和载物台之间有较大的工作距离,可以放置培养皿、细胞培养瓶等容器,辅助以相差的光学系统,可以很方便地对培养中的细胞进行观察。

【实验目的】

1. 掌握倒置相差显微镜的基本操作步骤。
2. 了解倒置相差显微镜的特殊组件、位置及观察活细胞的原理。
3. 了解肿瘤细胞的一般形态和生长状态。

【实验原理】

倒置相差显微镜是相差显微镜和倒置显微镜的结合,它既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。能直接对培养皿、培养瓶的标本进行显微观察。物镜在下,聚光器在上,被观察样品置于位于上方的聚光器之下,聚光器具有远大于物镜的工作距离。因此,适应于培养皿或培养瓶中样品的观察。

【实验准备】

1. 实验对象 培养皿(瓶)中的活细胞。
2. 实验器材及仪器 倒置相差显微镜。

【实验内容与方法】

1. 倒置相差显微镜的特殊组件 相差显微镜与普通光学显微镜的基本结构是相同的,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。它与普通光镜相比多了两个部件,一个是在聚光器上增加一个环形光阑,使透过聚光器的光线形成空心光锥、聚焦到标本上。另一个是在物镜的后焦面增加一个相板,相板有一个环形区,其大小恰好通过环形光阑的直射光,相板各区镀以不同物质,使得通过环形区的光比通过相板其他部位的光超前或滞后 $1/4$ 波长。相差显微镜的基本原理:把透过标本的可见光的光程差变成振幅差,从而提供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。用相差显微镜可观察活细胞,并可在镜下连续拍摄记录体外培养细胞的活动,如细胞分裂、细胞迁移运动等过程。

2. 使用倒置显微镜观察细胞 倒置显微镜中最常用的显微镜就是倒置相差显微镜(图 1-3)。由于这种显微镜不要求染色,是观察活细胞和微生物的理想方法,并可提供带有自然背景色的、高对比度的、高清晰度的图像。体外培养的肿瘤细胞主要有两种状态。一种是能贴附在培养支持物上的细胞,叫贴壁型细胞,体外培养的细胞绝大多数都属于这种细胞。另一种细胞并不贴附在容器的壁上,而是悬浮在培养液中生长,叫作悬浮型细胞,这类细胞主要是血液原性或癌原性的细胞。一种细胞在培养中的形态并不是永恒不变的,它随营养、pH、生长周期而改变,但在比较稳定的条件下形态基本是一致的。在贴壁细胞培养中,镜下折光率高、圆而发亮的一般被认为是分裂期细胞。

肿瘤细胞有重叠生长的特征。

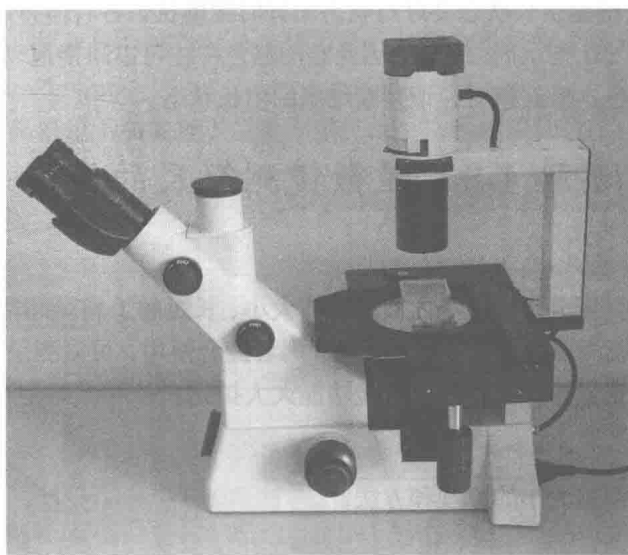


图 1-3 倒置相差显微镜

(1) 打开镜体下端的电控开关。

(2) 将细胞培养瓶从 37℃ CO₂ 培养箱中取出, 注意观察细胞培养液的颜色和清澈度。然后, 将细胞培养瓶平稳地放在倒置显微镜载物台上。此时应注意不要将瓶翻转, 也不要让瓶内的液体接触瓶塞或流出瓶口。旋转 4 孔转换器, 选择放大倍数较小的物镜观察, 并调节铰链式双目目镜, 舒适为宜。

(3) 调节光源: 推拉调节镜体下端的亮度调节器至适宜。通过调节聚光镜下面的光阑来调节光线的强弱。通过双筒目镜观察, 直至视野调到合适的亮度。

(4) 调节载物台的高度进行对焦。在看到细胞层之后, 再用细调节器将物像调清楚, 注意观察细胞的轮廓、形状和内部结构, 选择观察视野。

(5) 取下观察对象, 推拉光源亮度调节器至最暗。关闭镜体下端的开关。旋转 4 孔转换器, 使物镜镜片置于载物台下侧, 防止灰尘的沉降。

【注意事项与常见问题】

1. 所有镜头表面必须保持清洁, 落在镜头表面的灰尘可用吸耳球吹去, 也可用软毛刷轻轻地掸掉。

2. 当镜头表面沾有油污或指纹时, 可用脱脂棉蘸少许无水乙醇和乙醚的混合液 (3 : 7) 轻轻擦拭。

3. 不能用有机溶液清擦其他部件表面, 特别是塑料零件, 可用软布蘸少量中性洗涤剂清擦。

4. 在任何情况下操作人员不能用棉团、干布块或干擦镜纸擦拭镜头表面, 否则会刮伤镜头表面, 严重损坏镜头, 也不要用水擦拭镜头, 这样会在镜头表面残留一些水迹, 因而可能滋生霉菌, 严重损坏显微镜。

5. 仪器工作的间歇期间, 为了防止灰尘进入镜筒或透镜表面, 可将目镜留在镜筒上, 或盖上防尘塞, 或用防尘罩将仪器罩住。

6. 显微镜尽可能不移动, 若需移动应轻拿轻放, 避免碰撞。

7. 不允许随意拆卸仪器, 特别是中间光学系统或重要的机械部件, 以免降低仪器的使用性能。

【作业与思考题】

1. 贴壁细胞和悬浮细胞生长状态良好与状态不好时细胞状态各有何特点?
2. 由于培养基内有 pH 指示剂的存在, 因此它的颜色往往可以间接地表明细胞的生长状态。当培养液呈橙黄色、淡黄色、紫红色时, 请判断细胞的生长状态。

实验 1-3 显微镜测微尺的使用

【相关背景】

显微测微尺是用来测量显微镜视场内被测物体大小、长短的工具。测微尺分物镜测微尺(简称物微尺或台微尺)和目镜测微尺(简称目微尺), 两者配合使用, 可以测量细胞大小。测微尺将帮助我们对微观世界做出定量的分析, 使显微镜功能大大扩充。

【实验目的】

掌握用测微尺测定细胞大小的原理和方法。

【实验原理】

目微尺是一个可以放在目镜内的特制玻璃圆片, 圆片中央刻有一条直线, 此线分为若干格。物微尺为一载玻片中央封固的小尺, 长 1mm, 被等分为 100 格, 长为 0.01mm (10 μ m)。当测量细胞大小时, 不能用物微尺直接测量细胞, 而只能使用目微尺。因目微尺测量的细胞是经物镜放大后的像, 而它每格所代表的实际长度随物镜的放大率而变, 在测量时需要先用物微尺来标定, 求出某一放大率时目微尺每格所代表的实际长度, 然后再用以测定细胞大小。

将物微尺放在显微镜的载物台上, 小心转动目镜测微尺, 移动物微尺使两尺平行, 起点线重合, 然后找出另一处两尺刻度重合处, 记录起点线到重合线之间的各尺的刻度数(格数), 按下式计算, 在该放大系统下目微尺每格所代表的实际长度:

$$\text{目微尺每格所代表的实际长度} = \frac{\text{物微尺格数}}{\text{目微尺格数}} \times 10\mu\text{m}$$

例如: 目微尺是 100 格, 其对应的物微尺是 80 格, 则目微尺每格所代表的实际长度为 $80/100 \times 10 = 8\mu\text{m}$ 。

测量某一细胞时, 如果目微尺测得其横径为 5 格, 则此细胞横径为 $8 \times 5 = 40\mu\text{m}$ 。

【实验准备】

1. 实验对象 细胞装片。
2. 实验器材及仪器 普通光学显微镜, 目镜测微尺和镜台测微尺。

【实验内容与方法】

1. 目镜测微尺的校正

(1) 旋下目镜, 将目镜测微尺有刻度的一面向下, 放在视野透镜下方的环状光阑上, 再旋上目镜(图 1-4)。

(2) 把镜台测微尺放在载物台上夹好, 刻度朝上, 先用低倍镜观察, 对准焦距。旋转目镜, 使目镜测微尺与镜台测微尺的刻度平行, 移动推动器, 使两尺重叠, 再使两尺的“0”刻度完全重合, 定位后, 仔细寻找两尺第二个完全重合的刻度, 计数两重合刻度之间目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。按下式计算, 在该放大系统下目微尺每格所代表的实际长度:

目微尺每格所代表的实际长度 = 物微尺格数/目微尺格数 $\times 10\mu\text{m}$ 。

因为物微尺的刻度每格长 $10\mu\text{m}$ ，所以由下列公式可以算出目镜测微尺每格所代表的长度。

例如目镜测微尺 5 小格正好与物微尺 2 小格重叠，已知物微尺每小格为 $10\mu\text{m}$ ，则目镜测微尺上每小格长度为 $=2\times 10\mu\text{m}/5=4\mu\text{m}$ 。

用同法分别校正在高倍镜下和油镜下目镜测微尺每小格所代表的长度。

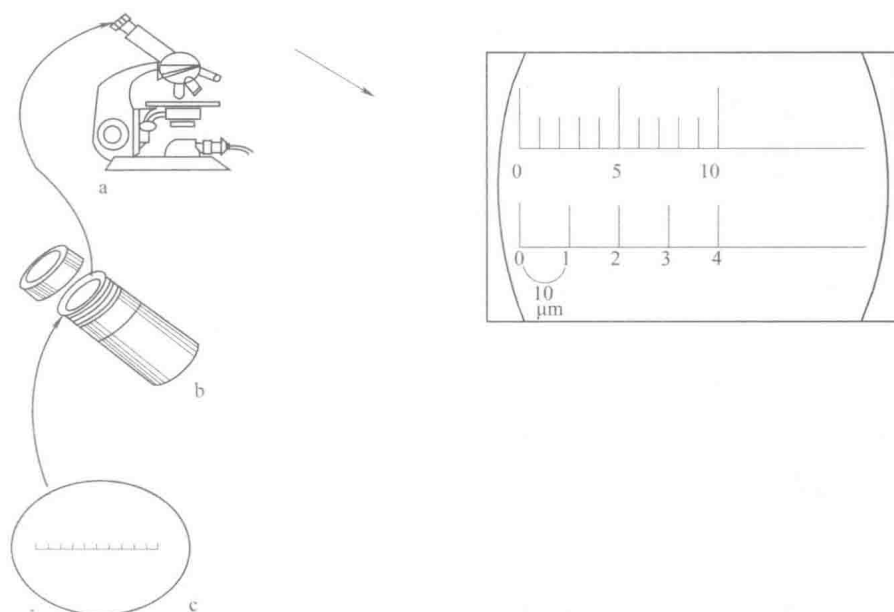


图 1-4 目镜测微尺的校正

由于不同显微镜及附件的放大倍数不同，因此校正目镜测微尺必须针对特定的显微镜和附件（特定的物镜、目镜、镜筒长度）进行，而且只能在特定的情况下重复使用，当更换不同放大倍数的目镜或物镜时，必须重新校正目镜测微尺每一格所代表的长度。

2. 细胞大小的测定

（1）取下物微尺，将制作的各种细胞临时装片置于载物台上。

（2）先在低倍镜下找到目的物，然后在高倍镜下用目镜测微尺来测量细胞的长，宽各占几格（不足一格的部分估计到小数点后一位数）。

（3）测出的格数乘上目镜测微尺每格的校正值，即等于该细胞的长和宽。

（4）一般测量细胞的大小需要在同一个标本片上测定 10~20 个细胞，求出均值，即得出被测细胞的大小（包括长径和短径）的实际长度。

【注意事项与常见问题】

1. 本测微尺系精密玻璃制品，使用时应注意小心轻放。
2. 勿使平面接触硬物及手指。
3. 使用前后用脱脂棉蘸酒精乙醚混合液清洁尺面。
4. 物微尺置于载物台，尺面朝上，调焦时，物镜头由下而上，以免压碎刻尺。
5. 长时间不用，应用柔纸包好放在干燥器内。

【作业与思考题】

1. 分别计算使用低倍镜（ $10\times$ ）和高倍镜（ $40\times$ ）时目镜测微尺每格代表的长度。

低倍镜：目镜测微尺每格代表的长度= $\times 10(\mu\text{m})=\mu\text{m}$

高倍镜：目镜测微尺每格代表的长度= $\times 10(\mu\text{m})=\mu\text{m}$

2. 测量 10 个细胞及细胞核的大小并记录：

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值
细胞大小	长径										
	短径										
细胞核大小	长径										
	短径										

3. 计算细胞核质比例

计算细胞、细胞核体积的公式：

球的体积计算公式： $V=(4/3)\pi R^3$ （半径是 R ）。

椭球体积公式： $V=4/3\pi ab^2$ （ a, b 分别为长、短半径）。

核质比 $N/P=V_n/(V_c-V_n)$ （ V_n 为核的体积， V_c 为细胞的体积）。

4. 为什么目微尺必须用物微尺标定？

附：其他几种显微镜简介

1. 荧光显微镜技术 荧光显微镜（fluorescent microscope）是以各种特定波长光源激发生物标本中的荧光物质，产生各种可见颜色荧光的一种显微镜。荧光显微镜一般采用高压汞灯和弧光灯作为光源，在光源和反光镜之间放一组滤色片以产生特定波长的激发光，光谱一般从紫外到红外，从而激发各种荧光物质产生不同波长的发射光。荧光显微镜技术是生物学和医学的重要研究手段，与生物学有关的荧光现象有三种：①自发荧光：通过激发光会使物体发出荧光，如叶绿素、维生素 A 等。②诱发荧光：通过诱导剂作用而发的荧光，如甲醛蒸气处理可诱发细胞和组织中生物单胺类产生荧光。③荧光染料染色荧光：如吖啶橙可以对细胞 DNA、RNA 同时染色，显示不同颜色的荧光，DNA 呈绿色荧光，RNA 呈橙色荧光。荧光染料可和抗体共价键结合，这种标记的抗体再和相应的抗原结合形成抗原抗体复合物，经激发后发射荧光，进行抗原定位。利用荧光显微镜可研究荧光物质在组织和细胞内的分布，以达到对细胞的特定物质进行定性、定位和定量观察的目的。如对生物组织、生理、病理、微生物、医药、食品、化学等诸方面的鉴定等。另外，由于荧光显微镜技术染色简便、敏感度高，而且图像色彩鲜明，所以是目前对特异蛋白质等生物大分子定性、定位的有力的工具。在细胞生物学研究中也广泛应用。

（1）荧光显微镜的基本工作原理

1）荧光：普通光是由发光体质点的热运动所引起的辐射；而荧光是非温度辐射，是一种冷光。荧光有多种，如光化荧光（由光源激发而产生的荧光）、放射荧光（由放射性物质激发而产生的荧光）、生物荧光（生物体发出的荧光）、化学荧光（如磷的氧化时发出的荧光）等。荧光显微镜既是利用“光化荧光”这一原理设计制造，从而达到荧光显微镜技术的镜检目的。

由于荧光显微镜的光源是利用人眼不可见的短波光——紫外线，因而就大大提高了物镜的分辨率，图像与背景的反差亦甚为明显。

2）荧光现象：将荧光物体放到光谱中的各色区域，就可发现引起荧光最有效的光线是光谱上波长较短的区域，即近紫外线区域，波长约为 320~400nm。这种现象的实质是分子吸收了短波光的能量（波长越短，光能越强），又以发光的形式以波长较长的荧光射出，而为人眼可见，这就是“荧光现象”。荧光接近可见光的红光端，大部分的荧光现象是符合这一规律的。荧光现象可分为两种：

第一次荧光现象：又称“固有荧光”或“自发荧光”即当某些物质在紫外线的照射下可发出可见光，如细胞内的叶绿素经紫外线照射后能发出红色的荧光。