

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

第 2 版

主编 张 莉 杨春雨



科学出版社

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

第2版

主 编 张 莉 杨春雨

副主编 刘 霞 李晓明 杜晓媛 李尘远 田 娟

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 丹 王雅光 田 娟 田 鹤 包翠芬

刘 霞 苏荣健 杜晓媛 李 虹 李尘远

李晓明 杨 静 杨春雨 宋小峰 张 勇

张 莉 张 萍 陈学军 单 颖 侯 威

陶嘉雯 薛占瑞 魏国华 杨 立

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材在第1版基础上按照现行培养方案进行修订。本书涵盖了人体形态学(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;第三篇是综合性实验,第四篇是创新性实验。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和实践能力;创新实验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药学专业的本、专科学生。

图书在版编目(CIP)数据

医学显微形态学实验 / 张莉, 杨春雨主编. —2 版. —北京: 科学出版社, 2018.2

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-054084-3

I. ①医… II. ①张… ②杨… III. ①人体形态学—显微术—实验—高等学校—教材 IV. ①R32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 187096 号

责任编辑: 朱 华 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

北京汇瑞嘉合文化发展有限公司 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: 787×1096 1/16

2018 年 2 月第 二 版 印张: 18.1/4

2018 年 2 月第十次印刷 字数: 488 000

定价: 88.00 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（第2版）

总编委会

主任 曲巍

副主任 崔洪雨 肖建英 王爱梅 温有锋

贾云宏 徐军 万义增

委员 （按姓氏笔画排序）

于利 于秋泓 万义增 王顺 王亚平

王昌军 左中夫 叶丽平 李华侃 杨菁

杨春雨 张莉 张轶博 单颖 徐军

高航 阎文柱

总策划 崔洪雨

秘书 马丽娜

总 序

医学专业教育不仅要让学生系统掌握医学理论知识,更需要关注学生实践技能、科学思维和创新能力的培养。实验教学与理论教学相辅相成,在全面提高医学教育质量方面有着理论教学不可替代的作用,是高等教育体系中的一个重要环节,是医学教育教学的重要组成部分。实验教材是体现实验教学内容和教学方法的知识载体,是指导学生动手操作、培养学生实践能力的重要工具,是做好实验教学、提高实验教学质量的重要保证,是培养创新型人才的重要手段。为顺应当代医学发展形势、满足医学教育和医学生培养需求,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,培养适应21世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才,从实际应用性出发,构建具有自身特点的实验教学内容和建材体系。

本系列实验教材第1版于2011年由科学出版社出版发行,为推动实验教学改革,整合实验教学资源,完善实验教学体系,提高实验教学水平,于2016年10月对第1版系列教材进行全面修订。第2版教材由长期工作在教学、科研、医疗第一线的具有丰富理论与实践教学经验的教师编写而成,延续上一版教材的结构框架,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、研究创新型实验,并依据学科特点适当调整结构比例,增加综合性、创新性实验项目,减少验证性实验。进一步整合、更新了实验项目,删减陈旧内容,纠正在使用过程中发现的问题,使实验项目设置更加科学,实验技术操作更加规范,更有利于培养和提高学生实践能力、观察能力、分析和解决问题能力。

第2版实验系列教材共八本,包括《医用化学实验》《医用物理学实验》《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》《临床技能学》。其中《临床技能学》融合视频、音频等富媒体技术,使纸质教材与数字教材有机地结合,顺应教材多样化、个性化的发展需要。

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实验教学内容。

在修订过程中,虽经全体编委努力工作及反复修改,但由于水平和时间限制,教材中难免有疏漏或缺陷,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

2017年7月

前 言

本教材是全国高等院校医学实验教学规划教材,是在第1版的基础上,编委们整合了细胞生物学、医学遗传学、组织胚胎学和病理解剖学的实验教学内容,同时结合多年实践教学经验编写而成。

随着国家对医学高等教育改革的逐步深入,医学实验教学的教学目标和教学内容也在发生深刻的变革。新时期医学人才的培养目标是培养基础知识扎实、实践能力强,同时具有一定的创新能力的医学人才;而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。努力打造以能力培养为主线的新的实验教学体系,探索和实践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,本教材就是在这种新的形势下编写而成。

本教材坚持传承和创新。既传承了传统的经典验证性实验教学内容,又在此基础上有所拓展,引入了显微镜及形态学技术、综合性实验和创新性实验。经典的验证性实验是教材的主体部分,它是前辈们经过多年的探索、实践和提炼,创建而成的实验教学体系,是实验教学的精髓,必须得到传承。而显微镜及形态学技术介绍了各种显微镜的结构、使用以及常用形态学技术方法;综合性实验和创新性实验展示了部分现代的、前沿的实验方法和研究手段,体现了现代科学的研究成果。这样,既可以开阔学生的眼界,又坚定了学生探索科学奥秘的信念,进而达到培养学生创新性思维的最终目的。

本教材组织4个学科的资深教授和优秀青年骨干教师,认真研究教材编写思路,精心筛选了实验内容,相信这套教材的出版会给我们的形态学实验教学带来改变,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。

由于编写水平和能力有限,难免有疏漏和不足之处,敬请广大同仁和师生们给予批评指正。

张 莉、杨春雨

2017年10月8日

目 录

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	第六节 数码显微互动教学系统的使用与数码显微摄像 12
第一节 普通光学显微镜的结构和使用方法 1	第二章 基本实验方法 14
第二节 荧光显微镜的结构和使用 6	第一节 病理标本取材 14
第三节 倒置相差显微镜的结构和使用 9	第二节 组织切片制作与 HE 染色 16
第四节 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理和应用 9	第三节 组织化学与细胞化学技术 20
第五节 电子显微镜的基本原理和应用 10	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 30
	第六节 组织培养技术 33
	第七节 常用电镜技术及标本制备 34

第二篇 经典验证性实验

第一部分 细胞生物学 40	第九章 内分泌系统 88
第一章 动物细胞的基本形态观察 40	第十章 消化管 91
第二章 细胞组分的化学反应 43	第十一章 消化腺 95
第三章 线粒体和液泡系的活体染色 46	第十二章 呼吸系统 98
第四章 细胞膜通透性的观察 49	第十三章 泌尿系统 100
第五章 细胞计数 51	第十四章 生殖系统 103
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 53	第十五章 中枢、皮肤、感觉器官 107
第七章 细胞分裂 56	第十六章 胚胎总论 113
第八章 细胞融合 58	第十七章 颜面发生 119
第九章 微丝的染色及形态观察 60	第十八章 消化系统和呼吸系统发生 121
第二部分 组织胚胎学 62	第十九章 泌尿系统和生殖系统发生 123
第一章 上皮组织 62	第二十章 循环系统的发生 126
第二章 结缔组织 66	第三部分 病理学 130
第三章 软骨组织和骨组织 69	第一章 适应、损伤和修复 130
第四章 血液 73	第二章 局部血液循环障碍 135
第五章 肌组织 76	第三章 炎症 138
第六章 神经组织 78	第四章 肿瘤 141
第七章 循环系统 82	第五章 心血管系统疾病 150
第八章 免疫系统 85	

第六章 呼吸系统疾病	158
第七章 消化系统疾病	165
第八章 淋巴造血系统疾病	173
第九章 泌尿系统疾病	175
第十章 生殖系统和乳腺疾病	182
第十一章 内分泌系统疾病	191
第十二章 神经系统疾病	196
第十三章 传染病	201
第十四章 寄生虫病	208

第四部分 医学遗传学	211
第一章 人类外周血淋巴细胞染色 体标本的制备	211
第二章 人类染色体常规核型分析	214
第三章 人类染色体 G 显带标本的 制备与分析	216
第四章 人类 ABO 血型检测	220
第五章 人类苯硫脲 (PTC) 尝味 实验	222

第三篇 综合性实验

第一章 形态学定量分析	224
第一节 显微测量	224
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	226
第三节 鼠肾发育的体视学分析	228
第二章 动物实验	231
第一节 血液循环与空气栓塞	231

第二节 肾脏血管分布特点与肾 缺血性梗死	231
第三节 小鼠胚胎标本的制作	232
第四节 血管内皮细胞的体外培养 与鉴定	233
第三章 疾病分析与诊断	235
第一节 诊断病理学概要	235
第二节 病例分析与诊断	243

第四篇 创新性实验

第一章 组织损伤与修复	251
第一节 肿瘤细胞凋亡的检测设计	251
第二节 局部因素对皮肤创伤愈合 的影响	253
第三节 坐骨神经分支选择损伤 模型的制备及行为学观察	254
第四节 小鼠癫痫模型的制备及 形态学检测	255
第五节 脑缺血再灌注损伤大鼠 模型制备及免疫组织化 学染色	257
第六节 危重病性肌病大鼠模型的 制备及 HE 染色	259
第七节 糖尿病肾病大鼠模型制备 及 PAS 染色	261

第八节 帕金森模型的制备及行 为学观察	262
第九节 大鼠肝损伤模型制备及 相关检测	264
第二章 肿瘤的生物行为学分析	267
第一节 肿瘤的侵袭及转移能力 分析	267
第二节 肿瘤的生长与凋亡分析	272
第三章 基因与遗传	280
第一节 人类性状的家系收集和 遗传分析	280
第二节 疾病家系收集和遗传 分析	281
第三节 遗传咨询	282
第四节 DNA 损伤与遗传性疾病	283

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

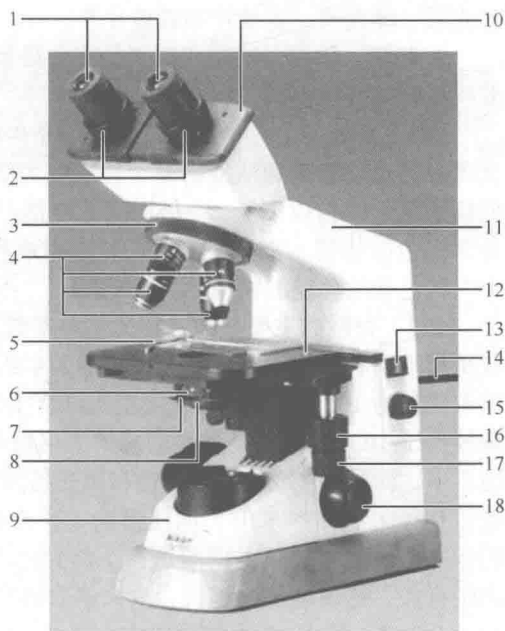


图 1-1-1-1 光学显微镜的结构

- 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 和 17. 推进尺; 18. 调焦装置

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。

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 0.1cm; 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) 不能变更的叫作固定式镜筒, 能变更的叫作调节式镜筒, 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, 因时间长了容易使光轴歪斜, 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是粗准焦螺旋, 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, 故叫作物镜或接物镜。

(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: 放大倍数为 100×, 指的是长度是 1μm 的标本, 放大后像的长度是 100μm, 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: 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

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 $R=0.61\lambda/NA$ 。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，上面的透镜叫作接目透镜，下面的透镜叫作会聚透镜或场镜。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，用来指示某个特点的目标。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，分辨清晰的实像进一步放大，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，但由于这两个物点的像的距离小于眼睛的分辨距离，还是无法看清。所以，目镜和物镜即相互联系，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。天然光源，光线来自天空，最好是由白云反射来的。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。如果物象不在视野中心,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象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,未见到物象,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,贮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。目镜内的视场光栏不能移动。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（乙醇 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。

（杨 立）

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】

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）光源的电路和包括变压、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。

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。

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。

紫外紫光压制滤片：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. 聚光镜 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。分明视野聚光器的暗视野聚光器两种。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）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，可透过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。

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。

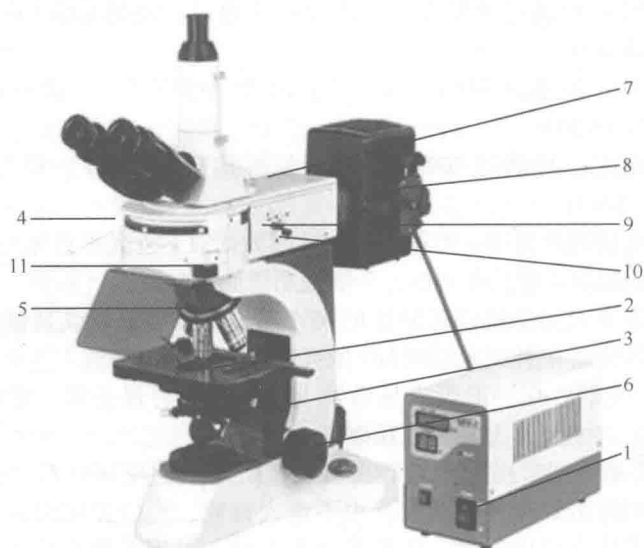


图 1-1-2-1 荧光显微镜

1. 开关; 2. 样品类; 3. X 轴、Y 轴旋钮; 4. 荧光组件室; 5. 物镜转换器; 6. 粗细调焦旋钮; 7. ND 滤光片; 8. 集光透镜聚焦钮;
9. 视场光阑旋钮; 10. 孔径光阑旋钮; 11. 挡板旋钮

【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, 使光源中心位于照明光斑的中央, 整个视野亮度均一。
6. 开始镜下观察标本。

【注意事项】

1. 荧光几乎都微弱, 应该在较暗的室内进行观察。
2. 未装滤光片不要用眼直接观察, 以免损伤眼睛。
3. 用油镜观察标本时, 一定要用“无荧光油”。
4. 高压汞灯关闭后, 不要立即重新打开, 需待 5 分钟后再启动, 否则影响汞灯寿命。
5. 如果长时间使用高倍镜观察, 会发生荧光衰减, 导致荧光图像反差减弱。使用 ND 滤光片或孔径光阑可减少激发光强度, 就能缓解样品荧光的衰减。
6. 根据所用的荧光染料选择与之匹配的荧光组件。当荧光亮度极弱时, 使用超宽带激发; 如果样品自发荧光很强, 则使用窄带激发。

第三节 倒置相差显微镜的结构和使用

【实验目的】

熟练掌握倒置相差显微镜操作方法；了解其结构及原理。

【实验原理】

普通光镜一般不能分辨未染色细胞的细微结构，这是由于各细微结构的折光性很近似或对比度不够。相差显微镜的结构特点是：①装有大小不同环状光阑的聚光器。环状光阑的作用是造成空心的光线锥，使直射光和衍射光分离。②物镜内装有位相板。相板的作用是使直射光和衍射光干涉，相位差变成振幅差，明暗反差加强，提高标本内各种结构之间对比度，从而使标本结构清晰可辨。③中心望远镜装置。倒置相差显微镜，是相差显微镜和倒置显微镜的结合，即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。

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。且相差系统的观察效果远好于一般光学观察系统。由于工作距离的限制，倒置显微镜物镜的最大放大率为 $60\times$ 。一般研究用倒置显微镜都配有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 及 $60\times$ 相差物镜。结构如图 1-1-3-1。

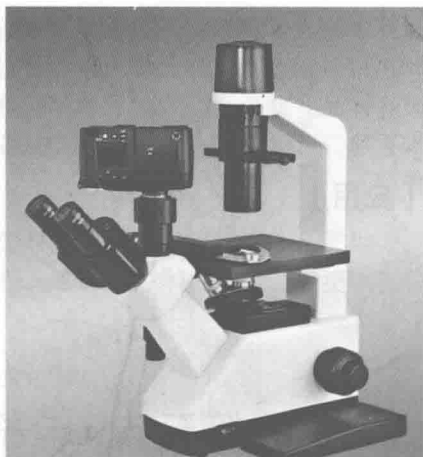


图 1-1-3-1 倒置相差显微镜

【实验方法】

1. 熟悉倒置相差显微镜的基本部件。
2. 将培养皿或瓶等放置载物台上，遵循先低倍后高倍的原则进行观察。注意，调节焦距可看到不同焦距水平的细胞。
3. 由于相位差增强了细胞核、细胞质等各部分的明暗反差，从而观察到明暗的图像。

(薛占瑞)

第四节 激光扫描共聚焦显微镜的基本原理和应用

【实验目的】

掌握激光扫描共聚焦显微镜的操作方法；了解激光扫描共聚焦显微镜的结构及原理。

【简介】

它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置，利用计算机进行图像处理，把光学成像（荧光显微镜）的分辨率提高了 $30\% \sim 40\%$ ，使用紫外或可见光激发荧光探针，从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像，其可以在亚细胞水平上观察诸如 Ca^{2+} 、pH、膜电位等生理信号及细胞形态的变化，激光共聚焦成像系统可以观察各种染色、非染色和荧光标记的组织和细胞等，成为形态学、细胞生物学、药理学、分子生物学、遗传学、神经生物学等领域中新一代强有力的研究工具。结构如图 1-1-4-1。