

李煜祥 林正眉 肖 智 编



生物学基础实验指导

SHENGWUXUE
JICHU SHIYAN
ZHIDAO



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS



生物学基础实验指导

SHIYONG WUXUE
JICHU SHIYAN
ZHIYAO

生命科学实验教材

生物学基础实验指导

李煜祥 林正眉 肖 智 编

暨南大学出版社
中国·广州

图书在版编目 (CIP) 数据

生物学基础实验指导/李煜祥等编. —广州: 暨南大学出版社, 2003.8
(生命科学实验教材系列)
ISBN 7-81079-273-3

I. 生…

II. 李…

III. 生物学—实验—高等学校—教材

IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 072131 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 编辑部 (8620) 85226205 85228986

营销部 (8620) 85226712 85228291 85220602 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 暨南大学出版社照排中心

印 刷: 暨南大学印刷厂

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 7.375

字 数: 168 千

版 次: 2003 年 8 月第 1 版

印 次: 2003 年 8 月第 1 次

定 价: 15.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社营销部联系调换)

前 言

生物学基础实验是为学习生物科学各专业的学生开设的一门基础课程，它不仅与生物学课堂讲授的基本理论、基础知识相结合，而且为学习后继专业课程和进行科学研究工作打下基础，同时又是培养学生独立思考、训练动手操作能力和提高观察分析能力的重要手段。

生物学基础实验课程是根据目前教学改革的需要而编写的。主要内容包括生物学方面的各种基础实验操作技术：各种类型的光学显微镜的使用方法、生物装片的各种制作方法、生物绘图方法、生物显微摄影技术等。结合实际的教学时数共编排了 15 个实验。

本实验课程除讲授必要的基础理论外，主要是以学生自己实践操作为主。为了培养学生的创新能力和精神，特别安排了一次综合性实验。

生命科学实验教材系列含：《生物学基础实验指导》、《微生物学实验指导》和《生物化学与分子生物学实验指导》等，由华南师范大学生命科学基础课实验教学示范中心组织编写并审核。

本书由我院多年从事教学的李煜祥、林正眉和肖智老师执笔编写。由于时间和水平的限制，书中难免存在不当与错误之处，恳请同行专家及广大读者批评指正，以便修改。

华南师范大学生命科学院
2003 年 7 月

实验规则

一、实验前应认真预习实验内容，明确实验目的要求，弄清操作步骤、方法和基本原理。作好计划，做到心中有数。

二、爱护实验室一切仪器设备，本着勤俭的原则，尽量节约水、电及一切消耗物品（如擦镜纸、吸水纸、染料、试剂、载玻片、盖玻片和实验材料等）。按操作规程使用各种显微镜、解剖镜、恒温箱、干燥箱、培养箱等贵重仪器。

三、遵守实验室规则，保持实验室清洁整齐。按所编排的位置就坐，不准随意走动，不准大声讲话，有问题要问时举手示意，保持实验室安静。

四、实验要严肃认真，观察过程要用专用的记录本作记录，用实验报告纸来绘图。实验做完后要按规定时间交实验报告。

五、每次实验做完后，每个同学及每个实验小组要清洁好自己的实验台及实验用具。一切共用实验用具用完后要擦洗干净，放回原处，损坏公物要自觉报告并做好登记。课后安排一个实验小组负责整个实验室的清洁卫生工作。

六、本实验课程要求同学自备下列用品：绘图铅笔 3H、HB 各一支，橡皮擦、尺子、记录本和实验报告纸。

目 录

实验 1	光学显微镜的构造和使用	(1)
实验 2	双目体视显微镜的构造和使用	(9)
实验 3	OLYMPUS BH2 系列显微镜 与 PM - 10AD 摄影装置的使用	(12)
实验 4	荧光显微镜的原理和使用	(18)
实验 5	相差显微镜的原理和使用	(23)
实验 6	微分干涉反差显微镜的原理和使用	(27)
实验 7	暗视野显微镜的原理和使用	(30)
实验 8	偏光显微镜的原理和使用	(34)
实验 9	显微测微尺和血细胞计数板的使用	(40)
实验 10	黑白胶片的冲洗、印相与放大	(45)
实验 11	生物绘图技术	(49)
实验 12	生物制片方法 (一) ——临时装片法	(52)
实验 13	生物制片方法 (二) ——徒手切片法	(56)
实验 14	生物制片方法 (三) ——石蜡切片法	(58)
实验 15	综合性实验	(66)
附录 1	电子显微镜应用简介	(67)
附录 2	显微摄影技术	(74)
附录 3	感光片的选用和黑白胶片冲洗药剂	(83)
附录 4	常用药品的配制方法	(91)
附录 5	植物标本的采集、压制和制作	(94)
附录 6	昆虫标本的采集和制作	(98)
附录 7	浸制标本的浸制与保存	(108)

实验 1 光学显微镜的构造和使用

一、目的

- (1) 掌握生物科学研究最常用的仪器——显微镜的基本构造。
- (2) 了解光学显微镜下所观察到的生物细胞的基本结构。

二、原理

人的眼球的构造亦像一光学仪器，当观察显微镜时，与显微镜的光学部分组成一个完整的系统。物体经过显微镜各透镜组的反复放大后映在眼球的视网膜上。为什么在显微镜下能观察到微细的物像，这就涉及到透镜成像的原理，这个原理也就是显微镜的光学原理。显微镜之所以能将物体放大，是通过透镜来实现的。虽然物镜和目镜的结构很复杂，但它们的作用都相当于一个凸透镜，其成像原理和光路图如图 1-1 所示。

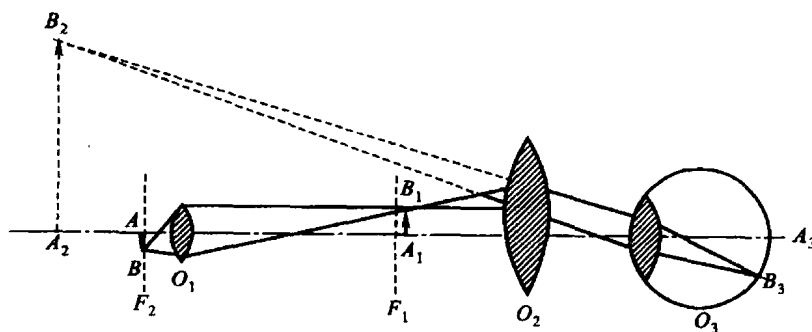


图 1-1 光学显微镜成像原理示意图

被检物体（ AB ）正好在物镜（ O_1 ）的前焦点（ F_1 ）之外（1~2 倍焦距之间），中间像（ A_1B_1 ）则正好在目镜（ O_2 ）的焦点（ F_1 ）之内，并形成正立放大虚像（ A_2B_2 ）在眼球（ O_3 ）的 2 倍焦距（ F_2 ）之外，最终在视网膜上形成正实像

被检物体 AB 放在物镜（ O_1 ）下方的 1~2 倍焦距之间，则在物镜（ O_1 ）后方形成一个倒立的特大实像 A_1B_1 ，这个实像正好位于目镜（ O_2 ）的下焦点之内，通过目镜后形成一个放大的虚像 A_2B_2 ，这个虚像通过调焦装置使其落在眼睛明视距离处，即 25mm，使所看到的物体最清晰，也就是说虚像 A_2B_2 是在眼球晶状体的

两倍焦距之处，在眼球后视网膜处形成一个倒立的 A_2B_2 缩小像 A_3B_3 。

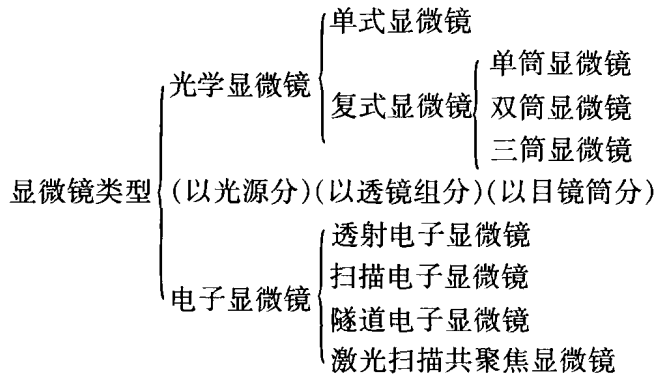
三、材料、试剂与器具

- (1) 材料：洋葱根尖纵切永久切片、人皮肤细胞永久切片。
- (2) 试剂：香柏油或石蜡油。
- (3) 器具：普通光学显微镜、擦拭纸、吸水纸。

四、操作步骤

(一) 显微镜类型

根据所使用的光源、组成透镜组的数目和目镜筒的数量等不同，显微镜可以分为下列类型：



(二) 光学显微镜的构造

光学显微镜的种类很多，其结构都是大同小异，可分为机械装置和光学系统两大部分。现以复式单筒显微镜为例作详细介绍。

1. 机械装置 (mechanical apparatus)

(1) 镜座 (base)。位于显微镜最下端，支持整个镜体，一般由马蹄铁构成。有的镜体装有照明光源。

(2) 镜柱 (pillar)。位于镜座与镜臂之间，以支持镜体。

(3) 倾斜关节。是镜柱与镜臂下方的连接点，可使显微镜在 90° 内作任意角度的倾斜，但一般不能超过 40° 。

(4) 镜臂 (arm)。作用是支持镜筒。有的镜臂是固定的，有的镜臂可以向后方倾斜。可倾斜的镜臂，既支撑镜筒又支撑载物台、聚光器和调焦装置等。

(5) 载物台 (stage)。为安放载玻片之处。载物台有圆形与方形两种。中央有一个圆形的通光孔，通光孔后方左右两侧各有一个压片夹，以固定标本避

免移动。

(6) 粗准焦螺旋 (coarse focus knob)。在镜臂的上方。用以调节显微镜的焦距。

(7) 细准焦螺旋 (fine focus knob)。位于粗准焦螺旋的下方。能更精细地调节显微镜的焦距。

(8) 镜筒 (tube)。金属制成的圆筒。上端安置接目镜头，下端连接镜头转换器，组成光学系统的光学筒长 (160 ~ 170mm)。

(9) 镜头转换器 (revolving nose piece)。在镜筒的下方。能安置 1 至数个物镜头，可以旋转，便于更换各个不同倍数的物镜头。

2. 光学系统 (optical system)

(1) 物镜 (objectives)。安装在镜筒的下端。靠近被观察的物体，因此也叫接物镜，是决定显微镜性能的重要部件。内由 1 ~ 5 组复式透镜所组成，上端的叫后透镜，下端的叫前透镜；镜身越长，放大倍数越高。在镜身周围刻有该镜头的性能参数。如刻有 10/0.25 和 160/0.17 等，这些参数的含义是：10 是指物镜的放大倍数，0.25 是指数值孔径 (numerical aperture) (即镜口率，以 N.A. 表示)，160 是指镜筒长度 (mm)，0.17 是指要求使用盖玻片的厚度 (mm)。

此外，在物镜上标志 10× 以下的称为低倍镜，40× ~ 65× 的称为高倍镜，90× 以上的称为油镜。

(2) 目镜 (eyepieces)。安放在镜筒的上端。因为它靠近观察者的眼睛，因此也叫接目镜。作用是把被物镜放大的图像进一步放大，它相当于一个放大镜。常用的目镜有 5×、8×、10×、25× 等。放大倍数越低，镜身长度越长。

在目镜筒内还设有一个内光圈，这个光圈可以阻挡透镜周围的光线，以减少误差，也即决定了视野的范围，因此它是一个视野光圈。在这个光圈上往往装有“指针” (用一段头发粘上去而成)，以指示要告诉别人的物体。目镜测微尺也是放在这个光圈上的。

显微镜的放大倍数是目镜的倍数乘物镜的倍数的积。如目镜是 10×，物镜是 40×，则其放大倍数是 $10 \times 40 = 400$ 倍。

(3) 反光镜 (mirror)。在载物台的最下方。一面是平的、另一面是凹的双面镜，可以反射和聚集光线。反光镜可以作任何方向的转动。

(4) 聚光器 (condenser)。聚光器由 1 ~ 3 块或更多的透镜所组成，它将反光镜反射过来的光线再集合后照射于被检的标本上，便于观察。聚光器有升降调节螺旋，可以调节光亮度。在聚光器下方装有可变光阑。

(5) 显微镜的照明方式。简单的光学显微镜一般用反光镜反射自然光 (外光源) 作为观察的照明方式，这种方式只能用于简单的观察。但较高级的显微镜都采用灯泡 (内光源) 作为照明方式。灯光照明也分为两种方式：一种为临界照明 (critical illumination)，从远处来的均匀的光通过聚焦作用，形成光源的

像于标本平面上，此平面也是物镜的对焦平面（图 1-2a）。在聚光镜的光圈开足时，最大的光束通过聚光镜，但并不能全部被物镜所利用。当缩小光圈时，使得通过聚光镜的光束正好等于物镜中所能得到的光束，从理论上讲，这时提供了最圆满的照明，这种特殊安排的照明，称为“临界照明”。临界照明一般光线不均匀，有灯丝的部分明亮，无灯丝的部分暗淡，不仅影响成像的质量，更不适于显微照相。另一种为柯拉照明（köhler illumination），照明光路中的光学组件包括光源、集光器、视场光阑、孔径光阑、聚光器和载物台。要想得到全视野的均匀照明，就要改变聚光镜的位置，也就是使集光镜与光源的距离增大，大于它的焦距。那么，在集光镜的另一边，将有光源的共轭焦点，在这里形成光源的像。通过调节集光镜的位置，可以使这共轭焦点位于聚光镜的光圈位置，而这点也是聚光镜的焦点。因此，通过聚光镜的作用，可使从这上面发出的光成平行，投射在标本上（图 1-2b），这时在标本平面上的像已不是光源的像，而是聚光镜的像。所以光源的不均匀现象消失了，而成为均匀而大面积的照明。这种使光源通过聚光镜在标本平面上成像的照明方法，在理论上不同于光源本身在标本平面上成像，所以这种方法叫柯拉照明法。柯拉照明比临界照明优越，其优点在于：一是照明均匀，因为在标本平面上成像的是视场光阑，而不是光源本身；其二是通过调节视场光阑的大小和位置可以控制标本平面上照明区的大小和位置。当只需要观察或测量标本的一部分时，可以关小视场光阑，减小照明区域，使标本的其他部分不受热，并可减少杂散光的干扰。

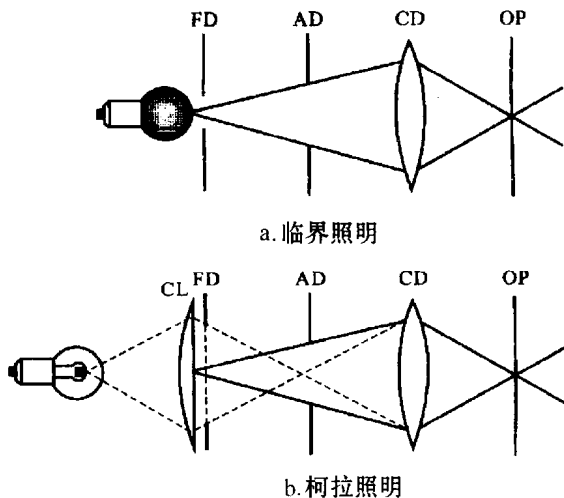


图 1-2 临界照明和柯拉照明

CL: 集光器; FD: 视场光阑; AD: 孔径光阑; CD: 聚光器; OP: 物台

(三) 光学显微镜的使用方法

使用光学显微镜关键是在于光亮度的调节和焦点距离的调节，使用步骤如下：

1. 低倍镜的使用

将显微镜正放在离桌边 4~6cm 处，镜臂靠自己的左胸前，检查显微镜的各部分是否完整无损。

(1) 对光。用手转动镜头转换器，把低倍物镜转到光轴的位置，将反光镜的平面转向光源，用左眼从接目镜中观察，使视野充满均匀的光亮；同时可调节聚光器或调节光阑，使光度适合。如光线仍不充足，可使用反光镜的凹面，以聚集更多的光线，使显微镜视野的光亮度达到最佳状态。

(2) 将玻片标本置于载物台上正对通光孔中央，然后用压片夹把玻片固定在适当位置上。

(3) 先从旁侧注视并向外徐徐转动粗准焦螺旋使物镜向下移动，至物镜的下方接近标本，这时切勿大意，以免使镜头与标本相碰。

(4) 左眼对准接目镜看下去，一边观察视野，一边用粗准焦螺旋缓慢地升高物镜，看到物像以后，再用细准焦螺旋作精密的调焦，这样就能得到清晰的物像。观察标本时，首先要了解概况，如在视野中看不到全景时，必须用一只手移动标本，用另一只手旋转细准焦螺旋。普通显微镜所造成的像是倒立像，所以标本向右移动时视野中的像则向左移动，两者的前后关系也是相反。

了解标本的概况后，再进行目标样本的详细观察时，可以再用高倍镜检视。

2. 高倍镜和油镜的使用

(1) 将要放大的部分移向视野的中央。

(2) 更换高倍镜头时，先换接物镜，如有必要再换接目镜。如镜头转换器上没有高倍镜的，要转动粗准焦螺旋把镜筒升高，再装上高倍的物镜。如镜头转换器上有高倍物镜，第一次使用时也要适当升高镜筒后进行旋转，因为物镜的放大倍数越大，物镜的镜身越长，所以由低倍镜转高倍镜时，要特别小心，以避免物镜与载物台或标本碰撞。但是如果使用显微镜较为熟练时，显微镜性能是良好的，物镜是属于原装镜头，一般可不必另行升高镜筒，直接用镜头转换器小心地更换高倍物镜即可。

(3) 镜头换好后，一边观察，一边再调节细准焦螺旋（此时不能用粗准焦螺旋），直到影像清晰为止。若光亮不足，可用反光镜的凹面镜取光，或升高聚光器，或将聚光器的光阑放到最大，使视野有足够而适度的光亮为止。

(4) 当用高倍镜观察清楚物体后，要想进一步放大物像，就要转用油镜头来观察了。其操作步骤是：先在镜头转换器上高倍镜的一侧装上油镜头，然后

将要放大的物像放在高倍镜视野的中央并调整焦点，再将高倍镜头移开光轴，在标本的盖玻片上滴上 1~2 滴香柏油，最后小心地将油镜头移到光轴上，使油镜头的下表面与香柏油均匀接触（不能有气泡），即可按高倍镜的观察方法进行操作。

3. 收镜

观察完毕后，应先将物镜头移离光轴，拿出玻片，避免因磨擦而损坏物镜头。然后把物镜头偏于两侧旁，降下镜筒，把反光镜竖直，将显微镜放回镜箱。

油镜头要从镜头转换器上取下来，先用干的擦镜纸擦 1~2 次，把部分油去掉，再用清洁剂（70% 乙醚 + 30% 无水乙醇）或二甲苯滴湿的擦镜纸擦 2 次，最后用干的擦镜纸再擦 1 次。标本上盖玻片的油也要用吸水纸蘸上清洁剂擦拭干静。

（四）显微镜使用的注意事项

（1）转换镜头时切勿用手直接推动物镜头，应转动镜头转换器，以免把物镜扭松而改变物镜头的工作距离。

（2）观察单筒显微镜时应用左眼，同时睁开右眼，以利于绘图和防止眼睛疲劳。

（3）使用显微镜时，应注意显微镜和切片的保护工作。

1) 携取显微镜时，应保持镜身直立平稳，一手紧握镜臂，另一手托稳镜座。

2) 要做好“四防”工作。

①防潮。显微镜应放在干燥的地方。如果长期放在潮湿的地方不使用，透镜容易发霉，不仅影响成像质量，还会腐蚀透镜表面造成透镜的损坏，显微镜的金属部分也容易生锈。特别在高温多雨季节，一定要采取防潮措施。不经常使用的显微镜，要擦拭干净后放在镜箱内保存。镜箱内一般都要有一两袋干燥剂，要经常检查干燥剂是否失效。在使用过程中也要注意防潮，特别是临时装片，水分切勿过多，观察时不能倾斜显微镜或倾斜角度过大，以免水分流到显微镜镜身上。万一水分沾在镜身上，要及时擦干。冬季在温度较低的环境中进行观察时，观察者呼出的水汽会在镜臂上凝聚成水珠，也要及时擦拭干净。

②防腐蚀。显微镜不要与腐蚀性的酸类和碱类药物放在一起，观察液体标本时，一般都要盖上盖玻片，如液体中有酸碱或腐蚀性化学物质时，要特别小心，观察完后要立即擦干净镜头和载物台。

③防热。显微镜不应在阳光下暴晒，以免造成损坏。

④防撞击。搬动显微镜时千万不要碰撞。显微镜有不灵活之处千万不要用力转动。遇有障碍时，应立即报告老师，切勿自行拆卸或修理，以免加大损坏。

在使用或保养过程中都要做好上面的“四防”工作，以延长显微镜的使用寿命。

(4) 显微镜的镜头不能随便拆装，清洁镜头要用擦镜纸或专用的绸布来擦拭，不能用手指、毛巾、纸或纱布等物来涂擦。

(5) 切片使用完后，应及时将它从载物台上取下放回切片盒或专用来盛切片的切片托板内，切勿放在桌面、书本或笔记本等物上面，以防损坏或散失，各实验小组要清点齐切片的数量。

(五) 显微镜的使用练习

(1) 取洋葱根尖永久切片，放在显微镜下观察，按照显微镜的使用方法，反复练习，能否见到根尖的细胞呢？移动玻片，视野内标本物像是否跟玻片的移动方向一致？用低倍镜观察分生区的细胞，找到有分裂相的细胞后，再用高倍镜观察，区别分裂期的特征，并计算其放大倍数。

细胞有丝分裂的观察。在高倍镜下找到有丝分裂的细胞后，选择较好的分裂相，将其移到视野的中央，然后按油镜的使用方法转用油镜来进行观察，了解有丝分裂染色体的特征。

(2) 取人皮肤细胞永久切片，在显微镜下观察细胞的形状和排列。选择 1~2 个典型的细胞，分析细胞下列部分的特点：

- 1) 细胞膜。它与洋葱根尖细胞有何不同？有什么特征？
- 2) 细胞质。分布在什么地方？有什么特点？
- 3) 细胞核。能否看到？为什么？

五、实验报告

在复式单筒显微镜构造图（图 1-3）的引线上，注明各部分名称及功能。（双筒内光源显微镜构造图如图 1-4 所示。）

六、思考题

从低镜转到高倍镜观察标本时，样本显得灰暗模糊，主要原因是什么？怎样解决？

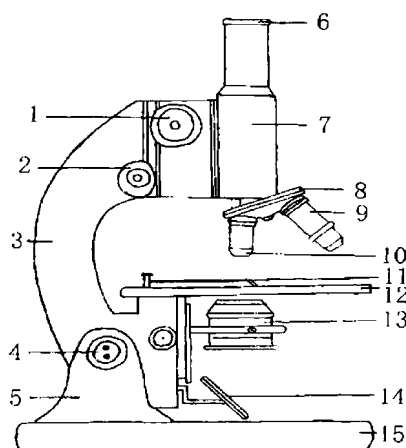


图 1-3 复式单筒显微镜构造图

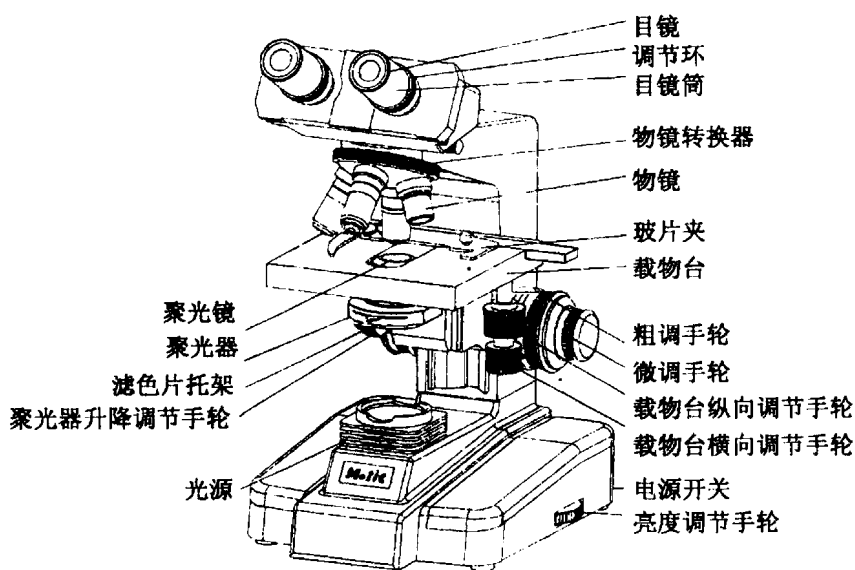


图 1-4 双筒内光源显微镜构造图

实验 2 双目体视显微镜的构造和使用

一、目的

- (1) 掌握在双目体视显微镜下解剖生物体器官的操作方法。
- (2) 了解被子植物花的基本结构以及双子叶和单子叶植物的种子或果实的基本结构。观察蝗虫外部形态特征。

二、原理

双目体视显微镜用于在显微镜下进行解剖的操作，实际上是由 2 套显微镜，即 2 个物镜、2 个目镜合并在一起使用。它所观察到的形象是立体的，因此又称体视显微镜（或实体显微镜）。它的结构原理和显微镜基本是一样的。但在显微镜中所见的物像是倒的，如果在解剖显微镜下见到的物像也是倒立的话，解剖操作就很不方便。因此解剖显微镜中在目镜与物镜之间有一个正影装置，即将倒像改为正像，正影装置是由几块棱镜所组成的。所以在解剖镜下见到的物像是正像，解剖操作就很方便了。

三、材料、试剂与器具

- (1) 材料：植物花和各种类型的种子；蝗虫。
- (2) 器具：双目体视显微镜、载玻片、实验解剖工具。

四、操作步骤

(一) 双目体视显微镜的基本构造

双目体视显微镜的结构比较简单，它主要由镜座和镜体两大部分组成。具体结构如图 2-1。

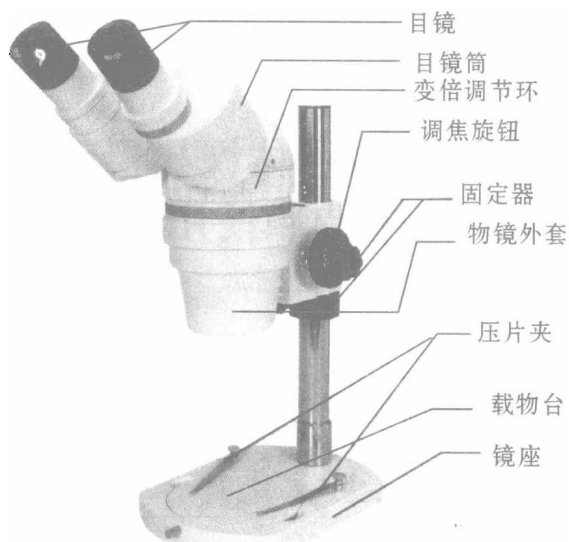


图 2-1 双目体视显微镜构造图

(二) 双目体视显微镜的使用方法

双目体视显微镜是用来解剖生物组织器官的重要仪器，主要用于整体解剖和观察生物的组织器官，其放大倍数不高，一般在 10~170 倍之间。有可连续变倍和不连续变倍两种类型，光源都是利用直射光线。

1. 使用操作步骤

(1) 将显微镜放在自己胸前的实验台面上，先调节好个人的眼间距，用两只手移动目镜筒，使两个目镜的间距与自己眼睛的间距相一致。

(2) 将要解剖的标本用载玻片载上放在载物台上，调节好照明光源，然后调节两眼的屈光度（视力度），如果左右眼睛的视力不一致，解剖时就会感到很吃力，同时眼睛会很容易疲劳，因此必须要调节屈光度，使两眼观察的物像同样清晰。方法是先用右眼和右目镜对焦（用较小的倍数），看清物体后，再用左眼和左目镜看样本。此时如果样本显得模糊不清的话，就用手左右转动左目镜筒的调节螺圈（此时千万不要转动解剖镜的调焦螺旋！），直至左眼也能看清样本为止。

(3) 一手拿镊子，一手拿解剖针，两眼紧靠目镜。在解剖镜下一边观察一边解剖。解剖顺序是从外到内、从大到小，从低倍到高倍逐层解剖观察，一边解剖一边做好记录。

2. 实物材料解剖观察

(1) 双子叶植物种子：菜豆（*Phaseolus vulgaris* L.）、蚕豆（*Vicia faba* L.）、花生（*Arachis hypogaea* L.）、蓖麻（*Ricinus communis* L.）种子的解剖观察。