

医学细胞生物学 与医学遗传学实验

主编 马连第
胡国明
刘瑞辉
主审 刘 宇
顾大龙
吴德全

辽宁科学技术出版社

9.2-33

D

医学细胞生物学与医学遗传学实验

主 编	马连第	胡国明	刘瑞辉			
副主编	张 明	张进忠	张志宏	张守中	葛盛东	孙永杰
主 审	刘 宇	顾大龙	吴德全			
编 者	张志宏	张进忠	赵丽萍	孙永杰	王宏英	邵亚群
	刘瑞辉	冯 慧	张 红	杨宏莉	钟初森	胡国明
	胡 青	葛盛东	梁 君	张守中	刘 宇	张 明
	解生权	马德坤	陈加力	邝 佳	马连第	顾竹琳
	耿建芳	席庆尧	胡贇水	李思虹	庞志阳	顾大龙
	吴德全	吕杰娣				



A0280006

辽宁科学技术出版社

辽新登字 4 号

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学与医学遗传学实验/马连第等主编.—
沈阳:辽宁科学技术出版社,1995.6
ISBN 7-5381-2149-8

I. 医… II. 马… III. ①人体细胞学:生物学—实验②医学遗传学—实验 IV. ①R329.2-33②R394-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (95) 第05344号

辽宁科学技术出版社出版

(沈阳市和平区北一马路108号 邮政编码 110001)

辽宁省新华书店发行 沈阳市第二印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 8¹/₄ 字数: 180,000
1995年6月第1版 1995年6月第1次印刷

责任编辑: 杜 通

版式设计: 于 浪

封面设计: 曹太文

责任校对: 赵淑新

插 图: 刘家则

印数: 1—7,600

定价: 7.20元

作者通讯地址: 鞍山市铁东区深沟寺15号

邮政编码: 114036

编写说明

为满足成人高等医学院校医用生物学教学的需要，由全国十三所职工医学院校组织编写了《医学细胞生物学和医学遗传学实验》一书，供各院校作为医学生物学实验教材使用。全书共编入实验二十二个，各院校可根据各自教学计划选择使用。在本书中附录了医学细胞生物学和医学遗传学的复习思考题和多选题，还编入了多选题答案，以期对学生在学习过程中能有所帮助。

参加编写的单位有：鞍钢职工医学专科学校、广东佛山职工医学专科学校、辽宁卫生职工医学院、武汉市职工医学院、河北省职工医学院、河南职工医学院、吉林省卫生管理干部学院、沈阳市职工医学院、广西卫生管理干部学院、天津市卫生职工医学院、河南焦作煤矿职工医学院、广东韶关大学医学系和河北峰峰矿务局职工医科大学。经协商由鞍钢职工医学专科学校、广东佛山职工医学专科学校和辽宁卫生职工医学院为三主编单位负责主持编写出版工作的实施。

尽管我们组织了各院校有一定水平和经验的同志参编，但仍难免有不当之处，请各单位在使用过程中多提出指正。

《医学细胞生物学与医学遗传学实验》编委会

一九九五年一月十五日

目 录

第一部分 实 验	1
实验须知	1
实验一 显微镜的结构及使用方法	2
实验二 电子显微镜生物标本的制备及观察	8
实验三 光镜下细胞器的观察和细胞活体染色	12
实验四 细胞的化学成分	15
实验五 细胞生理	18
实验六 细胞组分的分离与鉴定	21
实验七 细胞分裂	24
实验八 生殖细胞减数分裂	26
实验九 哺乳动物的解剖	29
实验十 果蝇染色体标本制备与观察	34
实验十一 小白鼠骨髓染色体标本的制备与观察	36
实验十二 人类染色体标本的制备与观察	38
实验十三 人类染色体核型分析	40
实验十四 人类染色体Ag—NOR的制片与观察	44
实验十五 姐妹染色单体互换SCE标本制备与观察	46
实验十六 人类染色体G显带标本的制备与分析	49
实验十七 性染色质检查	51
实验十八 人类ABO血型和PTC尝味测试及其基因频率和基因型频率 的计算	53
实验十九 人类若干遗传性状调查及系谱绘制	57
实验二十 人类皮肤纹理分析	58
实验二十一 血红蛋白溶液的制备及苯丙酮尿症的化学诊断	63
实验二十二 异常血红蛋白微量电泳筛选法	65
第二部分 《医学细胞生物学》与《医学遗传学》题集	68
《医学细胞生物学》复习思考题	68
《医学遗传学》复习思考题	73
第三部分 《医学细胞生物学》与《医学遗传学》多选题	80
第四部分 《医学细胞生物学》与《医学遗传学》多选题答案	124

第一部分 实 验

实 验 须 知

一、实验课的目的和要求

医学细胞生物学和医学遗传学实验课，是本学科教学的重要组成部分，是学习过程的重要环节之一。实验课的目的是：加深对课堂理论知识的理解，巩固和确认所学的理论知识，充实和补充一些在课堂教学中没有学到的内容，同时学习并掌握本学科的基本操作技术，培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力，培养学生严谨的科学作风和正确的思维方法，为今后进一步学习其它学科和将来实际工作打下良好的基础。

为了提高实验课的效果，要求同学做到以下几点：

1. 每次实验课前应作好预习，对实验的目的、原理、操作方法和注意事项等要做到概略的了解。

2. 在实验过程中，要坚持严肃性、严格性和严密性。认真按照指导教师和实验的要求进行操作。对示教的实验内容也要联系理论仔细地进行观察。

3. 实验结果要认真真实地记录下来，然后进行分析，得出结论。遇有和理论不符的结果时，应尽量探讨其原因，训练自己的科学思维。完成实验后，要写出实验报告，及时交指导教师批改。

4. 切实遵守实验室规则，防止发生各种事故。

二、实验室规则

1. 遵守实验课纪律，按时到达实验室，不迟到，不早退。实验中途因故需要外出时应向教师请假。

2. 进入实验室之前应穿好白大衣，随身携带必要的教材、实验指导、笔记本和文具等。

3. 必须严肃认真地进行实验，保持实验室内的安静和秩序。实验过程中不得高声谈笑和随意走动。

4. 实验室内各组的仪器设备、标本、药品和材料各组自己使用，不经指导教师允许，不得互相调换。如遇仪器出现故障，应及时报告指导教师，以便维修或更换，不得擅自拆卸。损坏器材和设备者应按有关规定进行赔偿。

5. 爱护仪器设备、标本。注意节约实验材料、药品和水、电等。

6. 保持实验室内整洁。实验结束后，各组应认真清理实验台面，将器材清洗后，点清数目，然后摆放整齐。值日生负责打扫室内卫生；关好水、电开关和门窗等，经教师允许后方可离开实验室。

7. 动物尸体和实验废物等应放在指定地点，不得随意乱丢。

三、生物绘图方法及要求

为了正确记录观察结果，加深印象，便于复习，现将绘图方法和注意事项说明如下：

1. 在仔细观察基础上，选择典型结构进行描绘，要求真实，准确。注意各部结构的比例关系。

2. 用铅笔绘图。线条要明确清晰。用线条表示图的范围，点表示明暗或浓淡，线条要均匀，点要圆润，不要随意进行美术加工。

3. 每幅图的大小、位置在报告中要安排得当，注意报告的整洁。

4. 图的位置一般偏于左侧，右侧作引线及注字，标明各部结构的名称，各引线要平行不得交叉。

5. 绘图注字应用铅笔以楷书写出，不可潦草。

(张志宏 吕杰娣)

实验一 显微镜的结构及使用方法

【实验目的】

了解显微镜的基本结构和性能，掌握一般光学显微镜的使用方法及保养事项。

【实验器材】

一、器材：普通光学显微镜。

二、材料：A字母装片，毛发装片、血涂片、擦镜纸等。

三、试剂：二甲苯、香柏油。

【内容与方法】

一、显微镜的结构

光学显微镜，简称光镜(Microscope)，是生物学及医学工作者必不可少的重要工具。每个医学生都必须了解显微镜的一般原理，熟悉它的结构和性能，掌握其使用方法。

现在我们所用的显微镜都是复式显微镜，虽然型号和外形有差异，但其结构和功能基本相似，都可分为三大部分构造，它包括机械部分、光学部分和照明部分(图1—1)。

(一)机械部分

1. 镜座：是显微镜的基座，以支持和稳定镜体。

2. 镜柱：是与镜臂和镜座相连的短柱。

3. 镜臂：镜柱上方呈弓形的部分，前上方与镜筒相连，下方经一活动关节和镜柱相接，是手持显微镜的部位。

4. 镜筒：安装在镜臂前方的圆筒状结构，上端装有目镜，下端装有转换器。可通

过调节器上下升降，调整物距。镜筒可分为单筒式和双筒式两类。单筒式又分直立式和倾斜式两种。双筒镜都是倾斜式的。

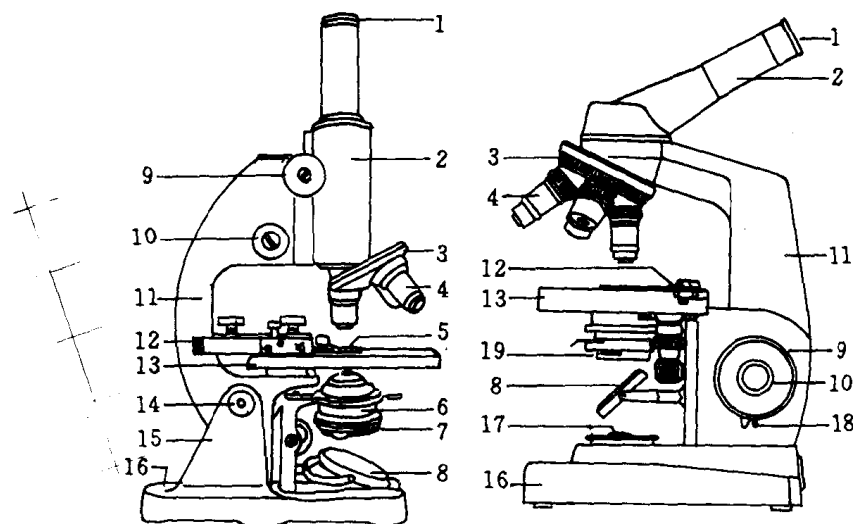


图1—1 显微镜的结构

1. 目镜 2. 镜筒 3. 物镜转换器 4. 物镜 5. 通光孔 6. 聚光器 7. 光圈 8. 反光镜 9. 粗调节器 10. 细调节器 11. 臂镜 12. 推进器 13. 载物台 14. 倾斜关节 15. 镜柱 16. 镜座 17. 照明装置 18. 粗调限位环凸柄 19. 滤光片座

直立式显微镜的目镜和物镜的中心线在同一直线上，镜臂和镜柱之间有一活动关节，称倾斜关节。使用时可使显微镜呈一定角度的倾斜，但倾斜角度不宜超过 45° ，以免翻倒。

倾斜式显微镜的目镜和物镜互成 45° 角，在镜筒的转折处有棱镜，使光线转折 45° 。

双筒式显微镜的目镜和镜筒之间有一环状结构，称镜筒长度补偿环，转动此环可调节目镜焦距。

5. 调节器：是调节物距的构造，位于镜臂前方或镜柱两侧，有大、小两个螺旋，大螺旋称粗调节器，转动时可使镜筒或镜台快速下降或上升。适于低倍镜使用。小螺旋又称细调节器，转动时能使镜筒或镜台缓慢升降，适用于高倍镜、油镜或分辨物像的清晰度和标本的不同层次。

有的显微镜调节器在镜柱两侧，为大小重合的圆形螺旋。外轮粗大称粗调节器，内轮较小称细调节器，性能基本一样。

6. 物镜转换器：物镜转换器为一圆盘状结构，位于镜筒下端。其下面有3—5个物镜孔；可安装不同倍数的物镜。更换物镜时，可转动转换器。盘内有一“T”形卡，每个物镜孔的边缘有一缺刻，用以对准位置和固定，使物镜和光轴同心。

7. 镜台(载物台)：转换器下方与镜柱相连的方形平台，用于放置玻片标本。镜台中央有一通光孔，由反光镜反射而来的光线，透过聚光镜经此孔射向标本。

8. 推进器：位于载物台的后方或侧面边缘，上有固定标本的弹性夹，可通过旋钮

转动，前后、左右移动标本。

推进器上一般有纵横游标尺，用于测定标本在视野中的方位和大小，游标尺一般由主标尺(A)和副标尺(B)组成。副标尺的分度为主标尺的 $\frac{9}{10}$ 。使用时首先看副标尺的0点位置，然后看主副标尺的一致点。如图1—2所示，副标尺的0点在主标尺的26与27之间，副标尺的6和主标尺的32一致。即6与主标尺上的一个刻度线正对，则此标尺所表示的数值为26.6mm。

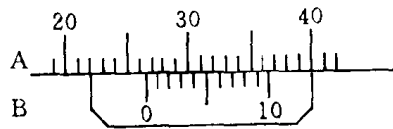


图1—2 游标尺的用法

(二)照明部分

1. 反光镜：位于镜柱前面的一个圆形、平、凹两面镜，能转向各方以采集光线，凹面有聚光作用，适用于较弱光和散射光。当光线较强时采用平面镜。

2. 聚光器：位于镜台通光孔下方，由一组透镜组成，可上、下移动，上升时光线增强，下降时光线减弱。

3. 光圈：装在聚光器下方，由许多金属片组成，外侧有一小柄，拨动时可使光圈扩大或缩小，以调节亮度。光圈大则光线强，适于观察深色标本；色浅或透明的标本，则应缩小光圈观察。

光圈下方有滤光片座(或环)，可放置各色滤光片。

(三)光学部分

1. 目镜：短圆筒状，装于镜筒上端。其上刻有“ $10\times$ ”或“ $15\times$ ”等符号，以表示目镜的放大倍数。倍数越大，目镜长度越短，反之亦然。目镜的口径一致，可互换使用。亦可在目镜筒内沾一段头发作为指针，以指明观察标本的部位。

2. 物镜：它是光学显微镜上最重要部分，安装在镜筒下端，依放大倍数不同，可分为低倍镜、高倍镜和油镜三种。

物镜的作用是将标本作第一次放大，然后再由目镜将物镜第一次放大的实像作第二次放大，物镜决定了显微镜的关键性能——分辨力的高低。

每个物镜上刻有相应的标记。“N·A”表示镜口率。如在10倍物镜上标有10/0.25和160/0.17。10为物镜的放大倍数，即 $10\times$ ，0.25为镜口率(或N·A 0.25)。160为镜筒长度，以mm为单位。0.17为所要求盖玻片的厚度。一般 $40\times$ 的N·A为0.65， $100\times$ 的N·A为1.25等。

从外形上也能区别几种物镜。低倍镜镜身短细，镜面直径最大，镜筒上刻有 $10\times$ 。高倍镜镜身较长而粗，其上刻有 $40\times$ 或 $45\times$ ，镜面直径较小，油镜镜身最长，镜面面积最小，其上刻有 $90\times$ 或 $100\times$ ，各种物镜筒下端常用红、黄或白圈表示。

显微镜放大倍数=目镜放大倍数×物镜放大倍数

二、显微镜的使用方法

(一)低倍镜的使用方法

1. 准备：打开镜箱，右手握镜臂，取出显微镜，左手托镜座，轻轻放于实验台坐位偏左侧，以镜座后端距桌边约5cm为宜。

2. 采光：先使用低倍镜，转动物镜转换器，使之正对通光孔，当听到轻微扣碰声

时，表示目镜和物镜的光轴一致。打开光圈，上升聚光器，转动反光镜(一般用凹面镜)，用左眼观察目镜，直到视野内光线明亮均匀为止。

3. 放置玻片：取一“A”字母玻片(或毛发装片)于载物台上，用弹簧夹固定，然后用推进器螺旋，移动标本于通光孔中央。

4. 调焦：从侧面注视低倍镜，向外转动粗调节器使镜筒缓缓下降(或上升镜台)，当物镜距玻片0.5cm处时，用左眼从目镜中观察视野，再慢慢向内转动粗调节器，使镜筒缓缓上升，(或使镜台下降)，直到视野中出现物像为止。

(二)高倍镜的使用方法

1. 依照上述操作程序，先在低倍镜下找到物像，将要放大的部分移至视野中央。

2. 从侧面注视物镜，用右手的拇指和食指卡着转换器的边缘转动，使高倍镜对准通光孔。

3. 用左眼观察目镜，慢慢上下转动细调节器(注意不要用粗调节器，以免镜台或镜筒快速上升或下降，使物镜和玻片相撞)。直到物像清晰为止。

如若使用的玻片厚度不标准(过厚)或显微镜物镜不配套，作第二步操作时，首先上升镜筒(或下降镜台)后再从低倍镜转换高倍镜。然后从侧面注视物镜，调节粗调节器使之缓慢下降，使高倍镜几乎接触玻片(间隔1mm左右)为止，再按第(3)步操作即可。

如按上述操作步骤找不到物像时，可能有如下原因：

(1)观察的标本不在视野之内，可转换回低倍镜，将所要观察的标本移至视野中央。

(2)检查一下标本片是否放反。

(3)标本染色太浅或透明，应调整聚光器或光圈减弱光亮。

当物像清晰时，物镜镜面与标本之间的距离，称为工作距离，物镜放大倍数越高，工作距离越短，反之亦然(图1—3)。

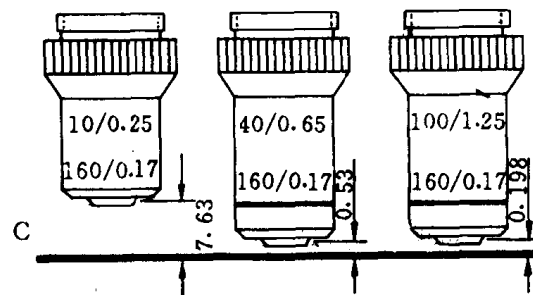


图1—3 物距的工作距离和同高调焦

C线为盖玻片的上表面，10×物镜工作距离为7.63mm；

40×物镜为0.53mm；100×物镜为0.198mm(XSB—02型显微镜)

更换标本时，要先移开物镜，然后再取出或放置标本。

若用高倍镜观察仍不清晰，或放大倍数太小时，需用油镜观察。

(三)油镜的使用方法

油镜和其它物镜不同的是载玻片与接物镜之间的介质不同。一般的物镜的介质为空气。

气，而油镜的介质为油层(镜头埋在油层中)。一般选用香柏油，主要是由于香柏油的折射率($n=1.51$)，与玻璃相同。当光线通过载玻片时，可直接经香柏油进入物镜而不发生折射，而增强视野的照明度。另一方面，利用油镜能够增加数值口径(显微镜的放大效能由数值口径决定)，从而提高显微镜的分辨力。

1. 转开高倍镜，在标本的正上方滴一滴香柏油，从侧面观察，转换油镜并使镜面与玻片上的油滴接触(注意用油镜时载物台不要有倾斜)。

2. 用左眼观察目镜，慢慢上下调细调节轮，直到观察到清晰物像为止。

3. 油镜使用完毕后，先上升镜筒，把镜头转到旁边，用擦镜纸把镜头擦干后，再用擦镜纸蘸少许二甲苯轻擦去掉镜头上的香柏油，最后再用干净的擦镜纸擦干净镜头上的二甲苯。

4. 玻片标本，同样用擦镜纸或蘸有二甲苯的擦镜纸擦干净后存放。无盖片的玻片不用擦以免损坏，临时装片，因有水分，不能用油镜观察。

(四)低倍镜和高倍镜使用练习

观察字母装片：取一张字母玻片，按上述低倍镜和高倍镜使用方法反复练习对光、调光，标本放置和调节焦距等。注意：如将玻片前后移动时，物像与玻片移动的方向是否一致，玻片上的字母呈正像或反像？为什么？

(五)油镜的观察使用练习

取血涂片一张，首先用低倍镜，再用高倍镜，最后用油镜观察，分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞，比较三种物镜的放大倍数和分辨力有何不同？

观察完毕后，务必将油镜用上述方法擦净。

三、注意事项

显微镜是一种精密的光学仪器，必须正确使用和维护。

1. 取放显微镜时，要轻拿轻放，规范操作，切忌单手斜提，前后摆动，以免碰坏和损坏零件。

2. 观察临时装片，不要倾斜镜台，即使观察永久玻片，也不要过分倾斜镜台，一般不超过 45° 。

3. 置片时，应将玻片标本的正面向上，否则低倍镜下观察的物像，在高倍镜下和油镜下将观察不到。

4. 不得随便取拿目镜，以免尘土落入镜筒内，更不得任意拆卸零件。

5. 使用完毕后，应上升镜筒，取下玻片，再下降镜筒，使物镜接近镜台，不得正对通光孔，然后将显微镜放回原处。

6. 维护显微镜清洁。机械部分如有尘土污染，可用擦镜布蘸少许酒精擦净。光学和照明部分污染时，用擦镜纸蘸少许二甲苯揩擦。使用时切勿用水或药物玷污镜头。

【作业与思考题】

1. 作业：

(1)简述显微镜的使用方法。

(2)填图注明光学显微镜各部分的结构名称。

2. 思考题:

- (1)怎样区分低倍镜、高倍镜和油镜?为什么用高倍镜或油镜时,必须从低倍镜开始?
- (2)如果在高倍镜下未找到你所要看的物像,你应该从哪些方面找原因,以求解决。
- (3)经过哪些步骤才能在物镜下找到清晰的物像。

附一、其它几种显微镜简介

1. 荧光显微镜:其特点是以紫外光为光源,利用紫外光照射,使标本内的荧光物质激发出不同颜色的荧光,以研究标本内某些物质的特征和位置。有的物质本身能发出荧光;有些物质须经荧光染料染色后才能发出荧光。

2. 相差显微镜:一般生活细胞在普通光镜下,不能分辨其微细结构。这是由于各细微结构的折光性很近似或对比不够显著的缘故。相差显微镜则在聚光器下装一个环状光阑,其物镜是安有相板的相差物镜。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。相板的作用是使直射光和衍射光发生干涉,导致相位差变成振幅差(即明暗差),使反差加强。所以,可以观察不用染色的生活细胞中的微细结构。

3. 倒置显微镜:物镜位于标本的下方,而光源在标本的上方。主要用于培养细胞时观察培养瓶中细胞的生长情况。

4. 暗视野显微镜:是一种具有暗视集光器或中央遮光板的显微镜。即在聚光镜上加上一特殊装置,使光线从集光器透镜的边缘衍射或反射到标本上,经标本反射投入物镜内,使整个视野变暗,故能在视野中见到被检物体衍射之图象。这种显微镜可观察运动着的有机体。

5. 双筒解剖显微镜:解剖较小标本或观察玻片标本的全貌时,需使用解剖显微镜,以观察自然状态的较小的实体(正像)和较大的玻片标本,或解剖细小生物。

附二、目镜测微器(尺)的用法

在显微镜下测定标本的大小,必须在目镜上配制目镜测微器。目镜测微器(尺)是一圆形的小玻片,上面刻有50等分的刻度(图1—4)。这种刻度只能代表相对长度(没有绝对值),所以在测量标本的大小时,首先要在各个不同倍数的物镜下镜台测微器(尺)进行标定后,才能代表实际长度。

1. 将镜台测微器置于载物台中央,用低倍镜观察,找出镜台测微器的刻度。

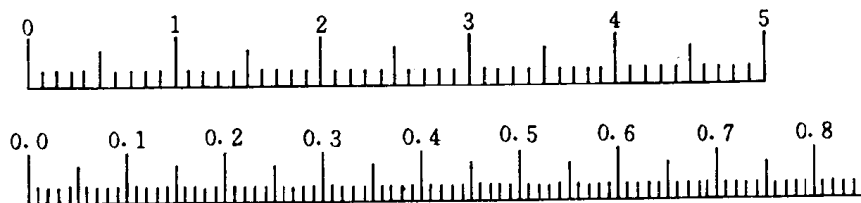


图1—4 目镜测微器(上)和镜台测微器(下)

2. 将目镜测微器装进目镜中，再按常规操作找到镜台测微器，把它移到视野中央，转动目镜，使目镜测微器和镜台测微器刻度平行，再移动镜台测微器，使两尺重叠，零点对齐，仔细观察并记录目镜测微器的全长所对应的镜台测微器中的mm数。

3. 如在低倍镜下所标定的目镜测微器的全长为0.685mm。由于目镜测微镜全长分为50等份格，故每小格的长度为：

$$\frac{0.685(\text{mm})}{50(\text{格})} = 0.0137\text{mm/格} = 13.7\mu\text{m/格}$$

4. 以同样的方法测定其它物镜，以标定目镜测微器每格的绝对长度，分别记录下来。

(注意，每台显微镜应用时，都必须逐个标定)。

5. 测量显微标本长度时，将镜台测微尺移去，换上标本。然后用目镜测微尺的刻度衡量标本的格数，再乘以每格的 μm 数，即为标本的实际长度。测量时可旋转目镜及移动玻片，置被测细胞于测微尺轴线(注意：被测物体要置于视野中央，测量同一被测物时要量3—5次以上，取平均值，以减少误差)。

(张进忠 赵莉萍)

实验二 电子显微镜生物标本的制备及观察

【实验目的】

了解电子显微镜的基本原理及电镜生物标本的制备方法和观察。

【实验器材与试剂】

一、材料和标本：家兔一只。

二、器材和仪器：透射电子显微镜；扫描电子显微镜；超薄切片机；解剖镜；震荡器；恒温箱；临界点干燥器；离子镀膜机；单面刀片；铜网；解剖器材。

三、试剂：乙醚；2.5%戊二醛；0.1mol/L(pH7.4)二甲砷酸钠缓冲液；1%锇酸；30%、50%、70%乙醇溶液；80%、90%、95%、100%丙酮溶液；环氧树脂包埋剂；醋酸铀染液；柠檬酸铅染液；双蒸水；2%单宁酸；乙酸异戊脂；液态 CO_2 。

【实验内容】

一、透射电子显微镜的标本制备及观察

(一)原理

电子显微镜是细胞生物学研究的重要工具，它以电子束为照明源，利用电子流具有波动的性质，在电磁场的作用下，电子改变前进轨迹，产生偏转、聚焦、发散，因而电子束透过标本后在电磁透镜的作用下可放大成像。高速运动的电子流其波长远比可见光波波长短，所以电镜分辨率远比光镜高，可达0.4nm，放大倍率可达80万倍。由热阴极

发射的电子在25—100kV加速电压作用下，经聚光镜聚焦成束，投射到很薄的标本上，并与标本中各种原子的核外电子发生碰撞，造成电子散射，在细胞质量和密度较大的部位，电子散射度强，成像较暗。其质量密度较小处电子散射弱，成像较亮，结果在荧光屏上形成与细胞结构相应的黑白图像。

(二)主要结构

电子显微镜由电子光学系统、真空系统和供电系统三大部分组成(图2—1、图2—2)。

1. 电子光学系统是电镜的主体，对成像和像的质量起着决定性的作用。它是由电子枪、聚光镜、样品室、中间镜、投影镜、观察室和照像室等部分构成。

2. 真空系统主要是使镜筒内保持高度真空，一般要求达到 10^{-4} 托 (1托 = 1mmHg)，是通过机械泵和油扩散泵接力排气及真空垫圈的密封作用来实现的。真空度可由真空表指示。由于电镜利用高速电子束为照明源，就要求在电子束的通道上不能有任何游离气体存在，以免与气体分子碰撞引起电离、放电、电子散射、灯丝氧化、样品被污染等而影响观察效果或发生故障。

3. 供电系统主要是提供稳定的电源，包括高压系统电源、各透镜的电源及真空泵的电源等。

(三)透射电镜生物标本超薄切片的制备(以家兔肝脏为例)

1. 取材：取活兔用乙醚麻醉，迅速打开腹腔，暴露肝脏，用锋利刀片切取 1mm^3 肝组织，立即投入固定液中。取材要求迅速，通常将动物麻醉取材。如动物处死后取材，要在几分钟内完成。取材最好在低温条件下进行 ($0-4^{\circ}\text{C}$)，以防止动物死后细胞缺氧发生超微结构变化。

2. 固定：把肝组织立即投入到 0.1mol/L (pH7.4) 的二甲砷酸钠缓冲液配制的 2.5% 戊二醛中， 4°C 固定两小时 (也可用 0.1mol/L (pH7.4) 的磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛)。然后用 0.1mol/L (pH7.4) 的二甲砷酸钠缓冲液洗三次，再放入相同缓冲液配制的 1% 锇酸中固定二小时 (4°C)。固定的作用是用化学试剂使细胞的微细结构如同生前状态

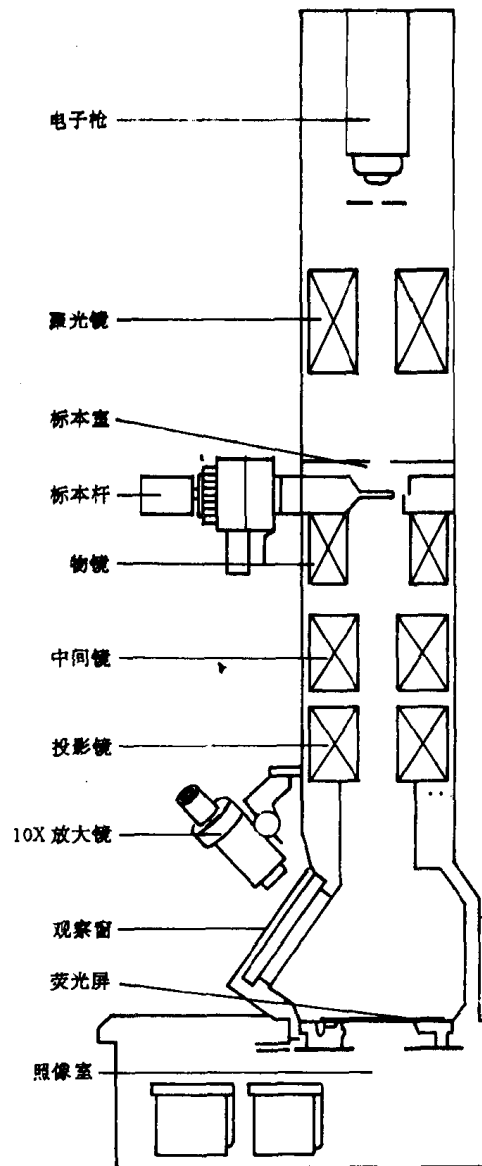


图2—1 透射电镜结构

精确地保存下来。固定剂后能迅速进入细胞，稳定细胞结构，使其不变形，在脱水过程中不丢失细胞成分。

3. 脱水：用双蒸水清洗固定好的肝脏标本，按顺序投入到30%、50%、70%的乙醇中，在4℃条件下各10分钟。然后再投入到80%、90%、95%的丙酮中各10分钟，一般可在室温下进行(如实验需要中途停顿可把标本放在70%乙醇中过夜)。脱水的目的是用脱水剂，把组织细胞内的游离水去除干净，使包埋剂能够均匀地渗入细胞内。

4. 浸透：把标本由100%丙酮中移入装有混匀包埋剂的小瓶中，在30℃下震荡4小时(可用红外线灯加温促进渗透)使包埋剂置换出标本中的丙酮。电镜生物标本常用环氧树脂作包埋剂，聚合后可切成超薄切片，并耐电子束轰击。

5. 包埋：把标本放入胶囊底部，将混匀的包埋剂分装入胶囊中，加好标签，勿使倾倒保持直立。

6. 聚合：把装有标本和包埋剂的胶囊置35℃、45℃、60℃温箱中各24小时，使包埋剂聚合、硬化。由流体变为均匀的固体。这样在切片时，包埋在其内的肝组织才能保持结构不变。

7. 超薄切片：一般透射电镜的切片厚度不能超过100nm，厚于100nm的切片，电子束不能穿透或影响观察效果。通常超薄切片的厚度为50—70nm。在切片前，要对标本包埋块顶端修成近45°角的四边锥体，使要进行切片的标本露出外表，呈长宽约为0.4×0.6mm的长方形或梯形切面。然后再把标本块夹在标本夹中，并把它固定在切片机的远端。切片刀是用玻璃制成(也可用钻石刀)，用胶布围成水槽，装满水，切下的切片漂在水面，用铜网收集。切片的厚度可以从切片与水面反射光所产生的干涉色来判断。

目前公认的树脂包埋切片厚度与干涉色关系如下：

干涉色	切片厚度
暗灰色	40nm以下
灰色	40—50nm
银白色	50—70nm
金黄色	70—90nm
紫色	90nm以上

8. 超薄切片机的操作(示教)。

9. 染色：在平皿中放一蜡纸片，滴一滴醋酸铀染液于蜡纸上，用弯头小镊子夹住铜网边缘，把贴有切片的一面朝下，轻轻插入染液中，盖上平皿盖，室温下染色10—20分钟。水洗后同上法再置入柠檬酸铅染液中染色15分钟，1%NaOH溶液洗一次，水洗二次，干燥后观察。染色的原理是利用重金属(如铅、铀等)与组织中某些成分结合，可提高这些组分对电子的散射能力，增进超薄切片中不同组织成分对电子散射的差异，使细胞的超微结构得到充分表现，形成与组织结构相应的图像，并提高图像反差，也称电子染色。

(四)观察家兔肝细胞的超微结构

1. 电镜操作(示教)。

2. 肝细胞的结构: 肝细胞为多角形, 一侧靠近血窦。核圆形1—2个, 位于细胞中央, 核仁1—2个。细胞质中有各种细胞器, 粗面内质网的膜平行排列, 聚集在一起。滑面肉质网为分支弯曲的囊管组成, 互相吻合成网, 排列密集。高尔基复合体排列在核的周围。还可见到溶酶体、过氧化物体、糖原、脂滴、分泌颗粒等。

二、扫描电子显微镜的标本制备和观察

(一)原理

电子枪发射出的热电子, 在加速电压作用下, 形成高速电子流, 经聚光镜聚焦和物镜的作用形成一极细的电子束, 扫描于标本表面。入射电子与标本中的原子相互作用产生二次电子, 二次电子的数量和每个电子的能量随标本表面形状及元素成分的不同而变化。二次电子被接收并经过放大, 即可在荧光屏上显现出被放大的标本表面图像。

(二)扫描电镜的构造(图2—2)

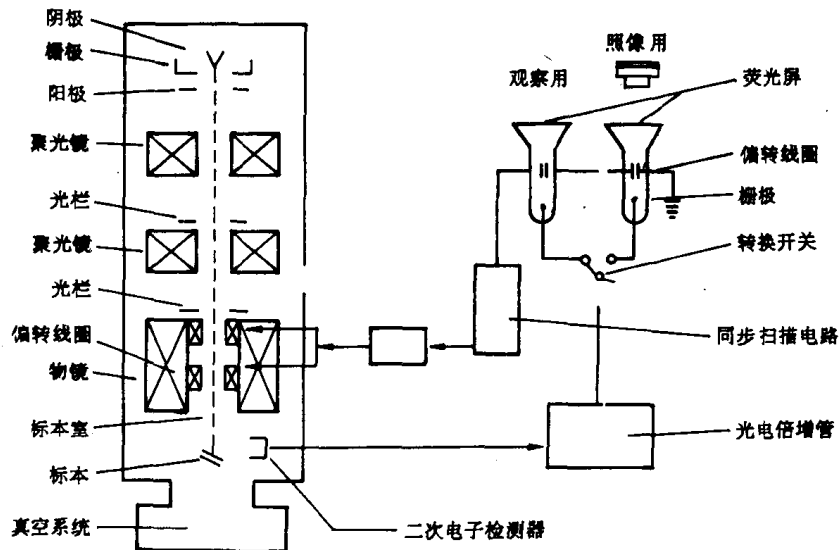


图2—2 扫描电子显微镜构造原理及主要部件

(三)扫描电镜标本制备(以家兔支气管为例)

1. 取材: 麻醉家兔, 解剖暴露支气管, 用刃器切取小段支气管, 剖开, 再切取 $2 \times 5\text{mm}$ 大小的一块管壁, 保护要观察的内表面(即粘膜面), 并用缓冲液或生理盐水清洗二次。如粘膜表面有较多粘液时, 可用胰酶溶液消化, 再清洗。

2. 固定: 把标本迅速投入固定液中, 其固定程序与透射电镜标本同。

3. 导电处理: 把经锇酸固定的标本清洗后放入2%单宁酸中处理10分钟, 再用双蒸水清洗3次, 然后放入1%锇酸中处理30分钟。

4. 脱水: 把用双蒸水洗过的标本依次放入30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇中脱水各10分钟, 然后将标本移入乙酸异戊酯中, 置换出乙醇。

5. 临界点干燥: 将标本置入临界点干燥器的密封标本室中, 打开进气阀门, 充入液体 CO_2 , 其量不少于标本室容积的 $2/3$ 。关闭开关, 并升温使达到临界状

态(31.4°C, 72.8大气压), 此时液态与气态界面消失。加温过程中温度可达40°C, 标本室内压力可达80—120大气压, 然后缓慢放气, 放气时间不应少于2小时。

临界点干燥是扫描电镜标本制备的一种重要的干燥方法, 它能消除表面张力, 使标本在干燥过程中, 不变形。

6. 镀膜: 把干燥的标本用导电胶固定在标本台上(注意观察面向上), 把标本台放在离子镀膜机阳极载台上, 在低真空下(0.1Torr)加高压电(1000—1200伏), 使阴极(金靶)与阳极间形成电场, 把残存的气体分子电离, 阳离子打向金靶, 金原子溅射出来落在标本表面, 形成一层金膜。这不仅保存了组织表面形态, 而且电子束射到标本上容易激发二次电子, 并有良好的导电性能, 可产生质量好的图像。

(四)观察支气管纤毛上皮的表面立体超微结构

1. 扫描电镜操作(示教)。

2. 支气管纤毛上皮表面结构, 支气管粘膜表面有许多纤毛, 纤毛排列密集, 是由纤毛细胞顶端发出的, 在纤毛间可见有杯状细胞, 在杯状细胞的表面有长短不一的微绒毛。

(张志宏 孙永杰)

实验三 光镜下细胞器的观察和细胞活体染色

【实验目的】

- 一、观察光镜下所能看到的动、植物细胞器的形态特征和分布情况。
- 二、了解细胞活体染色的方法和原理。

【实验器材与试剂】

- 一、材料: 蟾蜍肾切片, 兔脊神经节切片, 马蛔虫子宫横切片, 绿色水草叶片、洋葱鳞茎。
- 二、器材: 显微镜、载玻片、盖玻片、解剖刀、小镊子、牙签、吸管、滤纸。
- 三、试剂: 中性红——詹纳斯绿染液, 2% triton X—100液, 3% 戊二醛, 0.2% 考马斯亮兰染液、M—缓冲液、磷酸缓冲液。

【实验内容】

一、光镜下观察显微切片标本

(一)观察蟾蜍肾切片——示线粒体

低倍镜下可见到许多管腔大小不等的肾小管横切面(管腔呈圆形、椭圆形等)。肾小管的壁是由单层立方形或锥形上皮细胞围成, 细胞间界限不甚清楚。换高倍镜可见核圆形, 浅灰色, 核内有深染的核仁。核周围细胞质中有许多黑蓝色的颗粒状或短线状结构分布, 尤其是在上皮细胞近肾小管腔的一侧分布更多, 这些颗粒状或短线状结构即是线粒体。