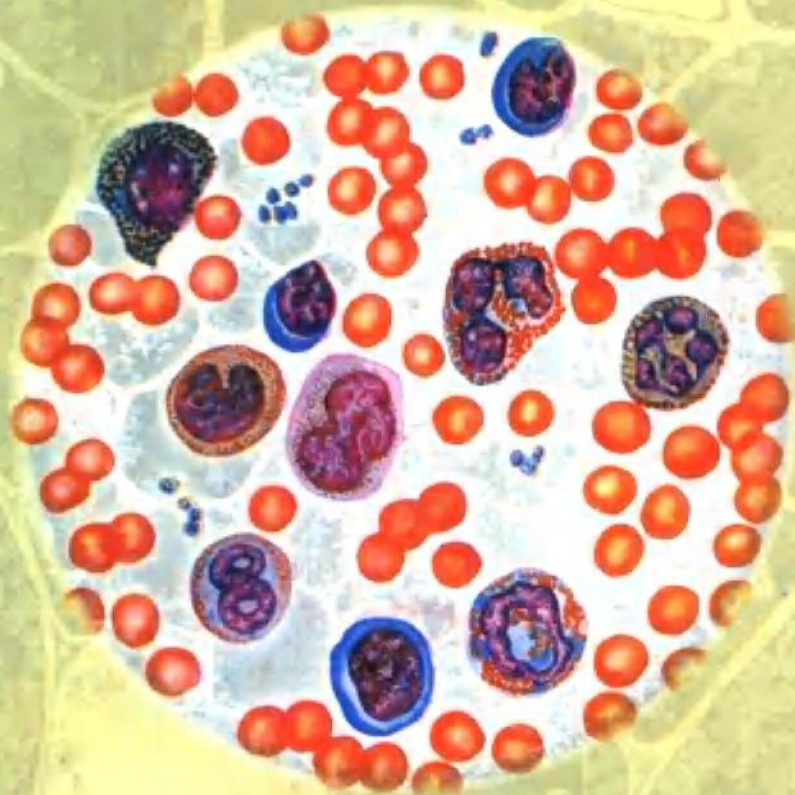


高等院校选用教材·医药类

医学细胞生物学实验与习题

赵 刚 刘建中 主编



科学出版社

医学细胞生物学实验与习题

赵 刚 刘建中 主编

内 容 简 介

本书共分上下两篇,上篇为细胞生物学实验指导,编入了13项重要的实验,在内容上既有经典项目,又有反映学科现代水平的实验,并注意了与医学的结合。下篇为细胞生物学的习题与解答,它以国内医学院校正在使用的细胞生物学理论教材为蓝本,内容包括细胞生物学的13个方面,题型分选择题(A、B、X型)、填空题、名词解释和问答题等。

读者对象:医学院校学生,其他院校有关专业学生。

医学细胞生物学实验与习题

赵 刚 刘建中 主编

责任编辑 牛海卫

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

湖北省金美印刷有限责任公司印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1999年10月第 版 开本:787×1092 1/16

1999年10月第一次印刷 印张:14

印数:1~8000 字数:345 000

ISBN 7-03-008014-9/R·505

定价:18.00元

《医学细胞生物学实验与习题》编委会

主 编：赵 刚 刘建中
副主编：魏会平 蔡巧青 李士怡
编 委：黄汉平 于从年 李士怡 蔡巧青
 魏会平 刘建中 赵 刚
主 审：余其兴

前 言

随着细胞生物学的迅速发展及其与医学关系的日益密切,大量的细胞生物学新理论、新技术被应用于基础医学和临床医学的许多领域,对医学的发展起到了一定的推动作用。在这种背景下,细胞生物学已成为高等医学教育不可缺少的基础理论课程。作为一门实践性很强的学科,细胞生物学每项新成果的取得都离不开实验,故对于这门课程的教学来说,实验课是一个重要的组成部分,它可以使学生获得广泛的有关细胞生命活动的感性知识,有效地提高理论课的教学效果,而学生基本技能的培养更离不开实验课。众所周知,实验教材是开好实验课的必备条件之一,但目前国内出版的、主要供医学院校使用的细胞生物学实验教材版本极少,远不能满足需要,广大师生迫切需要一本实用性和科学性俱佳的实验教材。另一方面,由于多年来在高考中取消了生物学科目,使得中学的生物学教学不太受重视,从而导致进入医学院校的学生对在低年级开设的细胞生物学课程普遍感到困难,学生们很希望有一本习题及解答之类的书籍供课后复习之用,以帮助他们较好地掌握该课程的基本理论和基础知识,训练思维能力,提高学习质量。基于以上原因,我们组织了国内几所医学院校多年从事细胞生物学教学的教师合作编写了这本包含有两部分内容的《医学细胞生物学实验与习题》。希望本书的出版有利于医学院校中细胞生物学实验课的开设,有利于学生们系统掌握该学科的基本知识,有利于解决他们在学习中所遇到的疑难问题。

全书共分上下两篇,上篇为细胞生物学实验指导,编入了13个重要的实验项目。在内容的选择上,既有经典项目,又有反映学科现代水平的实验,并注意了与医学的结合。其内容包括光学显微镜的结构与使用方法,细胞及细胞器的观察,细胞化学成分的显示,细胞生理活动的观察,细胞骨架和细胞超微结构的观察,体外培养细胞的计数、测量与死活鉴别,小鼠骨髓细胞染色体的制备与观察,细胞分裂的观察,细胞核与线粒体的分级分离,细胞的培养与保存技术,电子显微镜的结构与使用和显微摄影技术等。下篇为细胞生物学的习题与解答,这部分是以国内医学院校正在使用的细胞生物学理论教材为蓝本设计编写的,内容包括细胞生物学的发展简史和研究范围,细胞生物学的研究方法,细胞概述,细胞膜,内膜系统,线粒体,细胞骨架,细胞核,核糖体与蛋白质合成,细胞增殖,细胞分化,细胞衰老与凋亡及细胞工程等。题型包括选择题(A型、B型、X型)、填空、名词解释和问答题等多种形式,共计约3000余道,并附有参考答案。

参加本书编写的人员有中山医科大学刘建中、辽宁中医药大学李士怡、同济医科大学于从年、张家口医学院魏会平、武汉大学黄汉平、海南医学院蔡巧青、湖北中医学院赵刚等(以校名第一字的笔画为序)。初稿完成后,由刘建中和赵刚对所有内容进行了修改。全书的统稿、整理及插图的技术性处理由赵刚完成。对于实验部分的编写,我们注意阐明每项实验或某些关键反应的基本原理和相关的背景知识,以使学生全面了解实验中所涉及的理论问题。同时,在实验操作步骤的叙述上力求详尽,以方便学生独立完成实验项目。另外,对每项实验所涉及的试剂配制、仪器使用以及注意事项等都有较详细的说明。鉴于各个学校在教学要求和具体条件上不尽相同,在使用本书时,可根据各自的条件选择实施书中的实验项目。

本书的编写与出版得到了编者所在学校和科学出版社的大力支持,武汉大学生命科学学院博士生导师余其兴教授对全书进行了全面的审阅,在此一并表示衷心感谢。由于我们的水平有限,加上编写时间较为仓促,书中可能存在一些不足之处,希望广大师生批评指正。

赵 刚 刘建中

1999年8月于武昌云架桥

目 录

前 言	(i)
-----------	-----

上篇 医学细胞生物学实验

实验一 普通光学显微镜的结构及使用	(1)
实验二 细胞形态结构与细胞器的观察	(9)
实验三 细胞化学成分的显示	(17)
实验四 细胞生理活动的观察	(24)
实验五 细胞骨架和细胞超微结构的观察	(28)
实验六 体外培养细胞的计数、测量与死活鉴别	(34)
实验七 小鼠骨髓细胞染色体的制备与观察	(38)
实验八 细胞分裂的观察	(41)
实验九 细胞核与线粒体的分级分离	(46)
实验十 人染色体核仁形成区的银染显示	(49)
实验十一 动物细胞的培养、冻存与复苏	(52)
实验十二 超薄切片技术与透射电镜工作原理	(60)
实验十三 细胞的显微摄影技术	(69)

下篇 医学细胞生物学习题及解答

习题一 细胞生物学发展简史和研究范围	(78)
习题二 细胞生物学研究方法	(85)
习题三 细胞概述	(98)
习题四 细胞膜	(110)
习题五 内膜系统	(125)
习题六 线粒体	(134)
习题七 细胞骨架	(142)
习题八 细胞核	(153)
习题九 核糖体与蛋白质合成	(165)
习题十 细胞增殖	(177)
习题十一 细胞分化	(188)
习题十二 细胞衰老与细胞凋亡	(196)
习题十三 细胞工程	(200)
附录	(211)
一、化学试剂的分级和保存方法	(211)
二、试剂浓度的表示法及其计算	(211)
三、细胞培养中常用器物和溶液的灭菌	(213)
四、流式细胞术的原理及其应用	(215)
五、主要参考文献	(216)

上篇 医学细胞生物学实验

实验一 普通光学显微镜的结构及使用

【目的要求】

1. 熟悉普通光学显微镜的主要构造及其性能。
2. 掌握低倍镜及高倍镜的使用方法。
3. 初步掌握油镜的使用方法。
4. 了解光学显微镜的维护方法。

【实验原理】

光学显微镜(light microscope)简称显微镜或光镜,是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。显微镜的发明和使用已有 400 年的历史。1590 年前后,荷兰的汉斯(Hans)父子创制了放大 10 倍的原始显微镜。1665 年英国物理学家虎克(Hooke)研制出性能较好的显微镜并用它发现了细胞。400 年来,经不断改进,显微镜的结构和性能逐步完善,形成了品种繁多、型

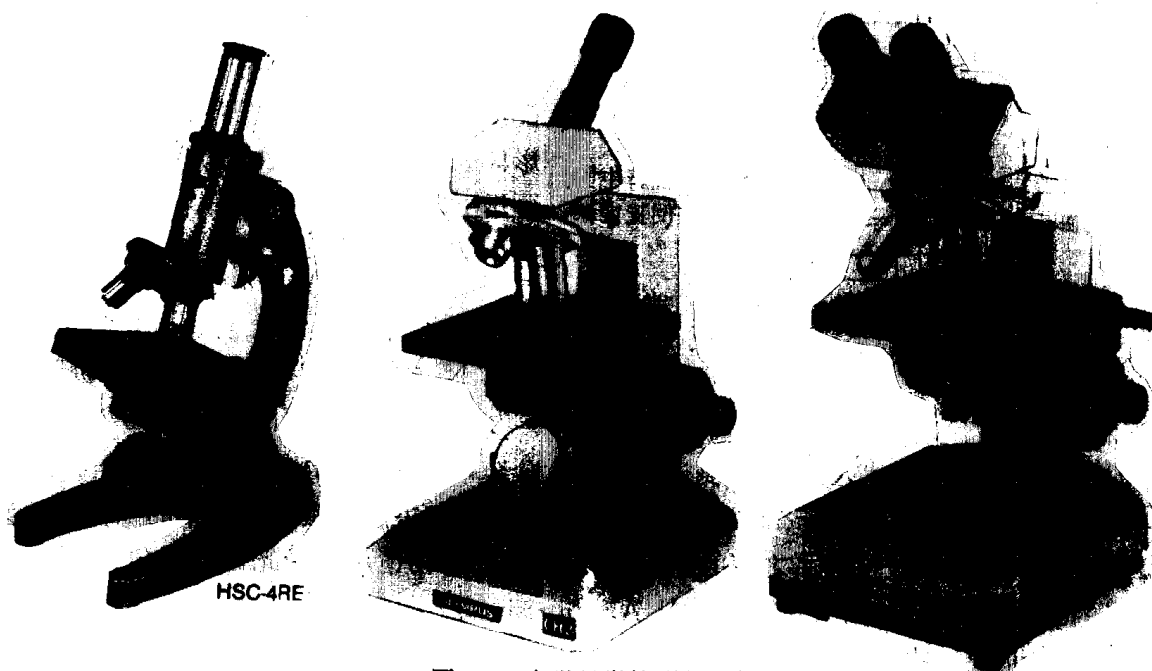


图 1-1 光学显微镜型号示例

号各异的光学显微镜系列(图 1-1)。除了广泛使用的普通光镜外,还有相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜和倒置显微镜等特殊功能或用途的光镜。形形色色的光学显微镜虽然外形和结构差异较大,但其基本的构造和工作原理是相似的。一台普通光镜主要由机械系统和光学系统两部分构成,而作为显微镜核心部分的光学系统则主要包括光源物镜、目镜、聚光镜和光源

等部件。

那么,光镜是如何使微小物体放大的呢?物镜和目镜的结构虽然比较复杂,但它们的作用都相当于一个凸透镜,由于被检标本是放在物镜下方的1~2倍焦距之间的,故物镜可使标本在物镜的上方形成一个倒立的放大实像,该实像正好位于目镜的下焦点(焦平面)之内,目镜进一步将它放大成一个虚像,通过调焦可使虚像落在眼睛的明视距离处,在视网膜上形成一个直立的实像。显微镜中被放大的倒立虚像与视网膜上直立的实像是相吻合的,该虚像看起来好像在离眼睛25cm处(图1-2)。

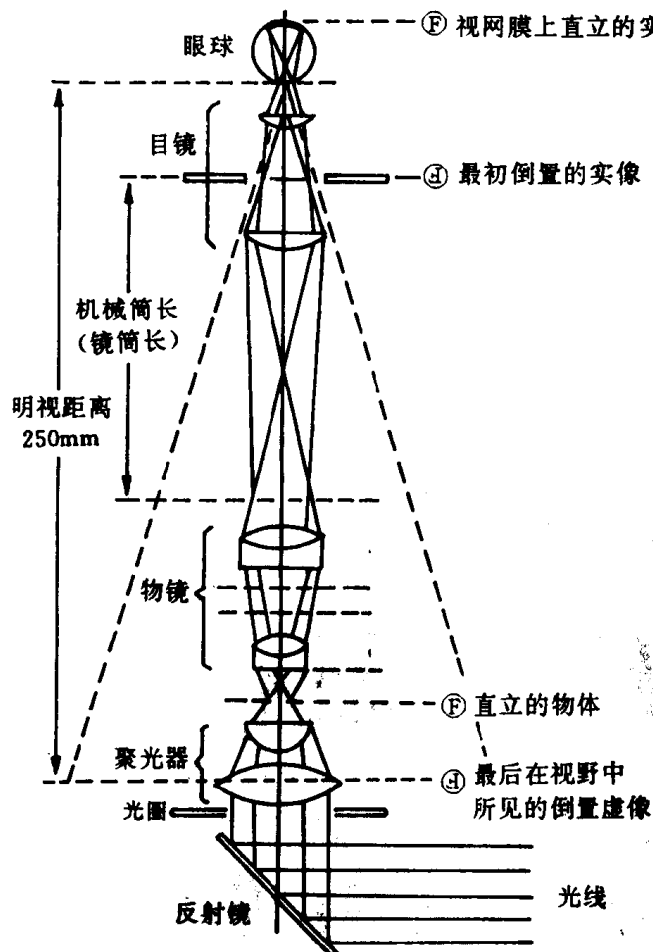


图1-2 光学显微镜的放大原理及光路图

一台显微镜的性能和质量的高低可由其各方面的指标来反映,包括分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等性能指标。这些性能都有一定限度,彼此既相互作用又相互制约,改善或提高某方面的性能,往往会使另一性能降低。

分辨率(resolving power)是光镜最重要的性能指标,也称分辨本领,是指显微镜或人眼在25cm的明视距离处,能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力,即分辨出标本上相互接近的两点间的最小距离的能力。据测定,人眼的分辨率约为 $100\mu\text{m}$,而光镜的分辨率可达 $0.2\mu\text{m}$ 。显微镜的分辨率由物镜的分辨率决定,物镜的分辨率就是显微镜的分辨率,而目镜与显微镜的分辨率无关,它只将物镜已分辨的影像进行第二次放大。光镜的分辨率(R)可用下式计算:

$$R = \frac{0.61\lambda}{N.A.} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin \alpha/2}$$

式中 λ 为照明光源的波长,白光约为 $0.5\mu\text{m}$, $N.A.$ 为镜口率, n 为介质的折射率, α 为镜口角, $\sin \alpha/2$ 的最大值为1, n 的最

大值为1.5。将这些数值代入公式,得到光镜的最大分辨率为 $R = 0.61 \times 0.5\mu\text{m} / 1.5 = 0.2\mu\text{m}$ 。

镜口率即数值孔径(numerical aperture, $N.A.$),是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数。 $N.A.$ 等于物镜和被检样品之间的介质的折射率(n)与物镜所接受光锥的顶角(α ,即镜口角)一半的正弦值的乘积,用公式表示为 $N.A. = n \cdot \sin \alpha/2$ 。

镜口角 α 指位于物镜光轴上标本的一个点发出的光线延伸到物镜前透镜的有效直径的两端所形成的夹角(即标本对物镜镜口张角的半角)。物镜与标本之间介质的折射率,空气为1,水为1.33,油为1.5左右。

从 $N.A.$ 的公式可以得知,镜口角越大,进入物镜的光线越多;介质的折射率越大,则数值孔径越大。一般来说,干燥物镜(以空气为介质)的 $N.A.$ 值为 $0.05 \sim 0.95$,水浸物镜为 $0.1 \sim 1.20$,油浸物镜(油镜)为 $0.83 \sim 1.40$ 。

物镜的数值孔径决定一台显微镜的主要光学能力, N. A. 与分辨率成正比, N. A. 越大, 显微镜的能力越强, 但 N. A. 与焦点深度(即当显微镜对标本的某一点或平面准焦时, 焦点平面上下影像清晰的距离或范围)成反比。各种物镜的数值孔径数值一般标刻在其外壳上。

放大率或放大倍数是光镜性能的另一重要参数, 一台显微镜的总放大倍数等于目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积。常用显微镜的最大放大倍数一般为 1600 倍。

光学显微镜是生物科学和医学研究领域常用的仪器, 它在细胞生物学、组织学、病理学、微生物学及其他有关学科的教学科研工作中有着极为广泛的用途, 是研究人体及其他生物机体组织和细胞结构强有力的工具。

【器材与试剂】

普通光学显微镜、擦镜纸、香柏油或液体石蜡(石蜡油)、血涂片、羊毛交叉装片、英文字母或数字装片、清洁剂(乙醚 7 份+无水乙醇 3 份)。

【内容与方法】

一、光学显微镜的基本构造及功能

(一) 机械部分

1. 镜筒(tube): 为安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构(图 1-3), 其上端可装载目镜, 下端与物镜转换器相连。根据镜筒的数目, 光镜可分为单筒式和双筒式两类。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种, 而双筒式光镜的镜筒均为倾斜的。镜筒直立式光镜与物镜的中心线(光轴)在同一直线上, 而镜筒倾斜式光镜的目镜与物镜的中心线互成 45° 角, 在其镜筒中装有能使光线转折 45° 的棱镜。

2. 物镜转换器(revolving nose-piece): 又称旋转盘, 是安装在镜筒下方的一圆盘状构造, 可以按顺时针或逆时针方向自由旋转, 其上均匀分布有 3~4 个圆孔, 用以装载不同放大倍数的物镜。转动旋转盘可使不同的物镜到达工作位置(即与光路合轴), 使用时注意凭手感使所需物镜准确到位。

3. 镜臂(arm): 为支持镜筒和镜台的弯曲状构造, 是取用显微镜时握拿的部位。镜筒直立式光镜在镜臂与其下方的镜柱之间有一倾斜关节, 可使镜筒向后倾斜一定角度以方便观察, 但使用时倾斜角度不应超过 45° , 否则显微镜由于重心偏移容易翻倒。

4. 调焦器(focusing adjustment): 也称调焦螺旋, 为调节焦距的装置, 位于镜臂的上端(镜筒直立式光镜)或下端(镜筒倾斜式光镜), 分粗调螺旋(大螺旋)和细调螺旋(小螺旋)两种。粗调螺旋可使镜筒或载物台以较快速度或较大幅度升降, 能迅速调节好焦距使物像呈现在视野中, 适于低倍镜观察时的调焦。而细调螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较大幅度地升降(升或降的距离不易被肉眼观察到), 适用于高倍镜和油镜的聚焦或焦距的精细调节, 也常用于观察标本的不同层次, 一般在粗调螺旋调焦的基础上使用。

有些类型的光镜, 粗调螺旋和细调螺旋重合在一起安装在镜柱的两侧。在右侧粗调螺旋的内侧有一窄环, 称为粗调松紧调节轮, 其功能是调节粗调螺旋的松紧度(向外转偏松, 向内转偏

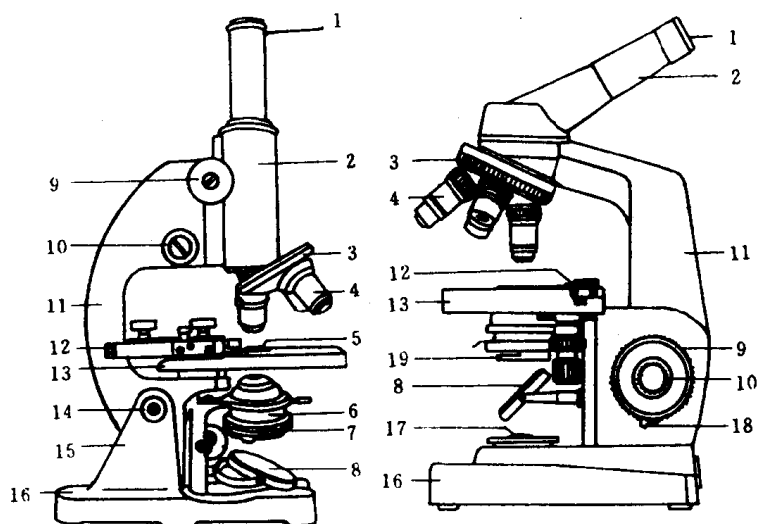


图 1-3 普通光学显微镜结构示意图

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. 镜臂 12. 移片器 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. 滤光片框

紧)。另外,在左侧粗调螺旋的内侧有一粗调限位环凸柄,当用粗调螺旋调准焦距后向上推紧该柄,可使粗调螺旋限位,此时镜台不能继续上升但细调螺旋仍可调节。

5. 载物台(stage):也称平台,是位于物镜转换器下方的方形平台,是放置被观察的玻片标本的地方。平台的中央有一圆孔称为通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。

在载物台上通常装有标本移动器(也称移片器),移片器上安装的弹簧夹可用于固定玻片标本,转动移片器的两个螺旋可使玻片标本前后左右地移动,寻找目标较为方便。

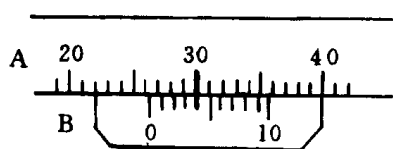


图 1-4 游标尺的用法

在移片器上一般还附有纵横游标尺,可以计算标本移动的距离和确定标本的位置。游标尺一般由主标尺(A)和副标尺(B)组成(图 1-4)。副标尺的分度为主标尺的 9/10。使用时先看副标尺的 0 点位置,再看主副标尺刻度线的重合点即可读出准确的数值,图 1-4 中所示的数值应为 26.4mm。

6. 镜柱(post):将镜臂与镜座相连的短柱。

7. 镜座(base):位于最底部的构造,为整个显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

(二) 光学系统部分

镜筒的光学系统主要包括物镜、目镜和照明装置(反光镜、聚光器和光圈等)。

1. 目镜(ocula):又称接目镜,安装在镜筒的上端,起着将物镜所放大的物像进一步放大的作用。每个目镜一般由两个透镜组成,在上下两透镜(即接目透镜和会聚透镜)之间安装有能决定视野大小的金属光阑——视场光阑,此光阑的位置即是物镜所放大实像的位置,故可将一小段细金属丝或头发粘附在光阑上作为指针,用以指示视野中的某一部分供他人观察。另外,还可在光阑的面上安装目镜测微尺。每台显微镜通常配置 2~3 个不同放大倍率的目镜,常见的有 5×、10×和 15×(×表示放大倍数)的目镜,可根据不同的需要选择使用,最常使用的是 10

×目镜。

2. 物镜(objective):也称接物镜,安装在物镜转换器上。每台光镜一般有3~4个不同放大倍率的物镜,每个物镜由数片凸透镜和凹透镜组合而成,是显微镜最主要的光学部件,决定着光镜分辨力的高低。常用物镜的放大倍数有10×、40×和100×等几种。一般将8×或10×的物镜称为低倍镜(而将5×以下的叫做放大镜);将40×或45×的称为高倍镜;将90×或100×的称为油镜(这种镜头在使用时其顶端需浸在油中)。

在每个物镜上通常都刻有能反映其主要性能的参数,主要有放大倍数和数值孔径(如10/0.25、40/0.65和100/1.25)、该物镜所要求的镜筒长度和标本上的盖玻片厚度(160/0.17,单位mm)等(图1-5),另外,在油镜上还常标有“油”或“oil”字样。

油镜在使用时需要用香柏油或石蜡油作为介质,这是因为油镜的透镜和镜孔较小,而光线要通过载玻片和空气才能进入物镜中,玻璃与空气的折光率不同,使部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,而使视野暗淡,物像不清。在玻片标本和油镜之间填充折射率与玻璃近似的香柏油或石蜡油时(玻璃、香柏油和石蜡油的折射率分别为1.52、1.51和1.46,空气为1),可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨率。物镜分辨率的大小取决于物镜的数值孔径,其数值越大,则表示分辨率越高。

不同的物镜有不同的工作距离,所谓工作距离是指显微镜处于工作状态(焦距调好、物像清晰)时,物镜最下端与盖玻片上表面之间的距

离。物镜的放大倍数与其工作距离成反比(表1-1)。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需用细调螺旋稍加调节焦距便可见到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。不同放大倍数的物镜也可从外形上加以区别,一般来说,低倍镜最短,油镜最长,而高倍镜的长度介于两者之间。

3. 聚光器(condenser):位于载物台的通光孔的下方,由聚光镜和光圈构成,其主要功能是将光线集中到所要观察的标本上。聚光镜由2~3个透镜组合而成,其作用相当于一个凸透镜,可将光线汇集成束。在聚光器的左下方有一调节螺旋可使其上升或下降,从而调节光线的强弱,升高聚光器可使光线增强,反之则光线变弱。

表 1-1 标准物镜的性质

放大倍数	数值孔径	工作距离(mm)
10×	0.20	6.5
20×	0.50	2.0
40×	0.65	0.6
100×	1.25	0.2

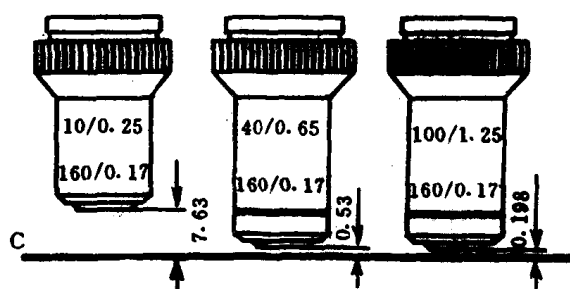


图 1-5 物镜的性能参数及工作距离

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)。10/0.25、40/0.65、100/1.25表示镜头放大倍数和数值孔径。160/0.17表示显微镜机械镜长(标本至目镜的距离)和标准盖玻片厚度,即镜长160mm,盖片厚度0.17mm。

光圈也称为彩虹光阑或孔径光阑,位于聚光器的下端,是一种能控制进入聚光器的光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成,其外侧有一小柄,可使光圈的孔径开大或缩小,以调节光线的强弱。在光圈的下方常装有滤光片框,可放置不同颜色的滤光片。

4. 反光镜(reflection mirror):位于聚光镜的下方,可向各方向转动,能将来自不同方向的光线反射到聚光器中。反光镜有两个面,一面为平面镜,另一面为凹面镜,凹面镜有聚光作用,适于较弱光和散射光下使用,光线较强时则选用平

面镜。

二、光学显微镜的使用方法

(一) 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约 3~6cm 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,要求双眼同睁,双手并用,逐步养成左眼观察、右眼看图,左手调焦、右手移片或绘图记录的习惯。

(二) 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(即对准通光孔),当镜头完全到位时,可听到轻微的扣碰声。

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),然后用左眼向着目镜内观察(注意勿闭右眼),同时调节反光镜的方向,使视野内的光线均匀、亮度适中。

2. 放片: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。然后转动移片器的螺旋,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,以避免镜头碰破玻片)。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,可用标本移动尺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。

(三) 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准焦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、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准焦。

由于制造工艺上的原因,许多显微镜的低倍镜视野中心与高倍镜的视野中心往往存在一定的偏差,因此,在从低倍镜转换到高倍镜观察标本时常会给观察者迅速寻找标本造成一定困难。为了避免这种情况的出现,使观察者在高倍镜下能较快找到所需放大部分的物像,可事先利用羊毛交叉装片标本来测定所用光镜的偏心情况,并绘图记录制成偏心图。具体操作步骤如下:① 在高倍镜下找到羊毛交叉点并将其移至视野中心;② 换低倍镜观察羊毛交叉点是否还位于视野中央,如果偏离视野中央,其所在的位置就是偏心位置;③ 将前面两个步骤反复操作几次以找出准确的偏心位置,并绘出偏心图。当光镜的偏心点找出之后,在使用该显微镜的高倍镜观察标本时,事先可在低倍镜下将需进一步放大的部位移至偏心位置处,再转换高倍镜观察时,所需的观察目标就正好处在视野中央。

(四) 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部分移至视野中央。
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。

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时,可将视野中的指针(装在目镜中的头发或细铜丝)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。

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,先用干擦镜纸揩擦一次,把大部分的油去掉,再用沾有少许清洁剂或二甲苯的擦镜纸擦一次,最后再用干擦镜纸擦一次。

至于玻片标本上的油,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,最后罩上塑料袋放回镜箱中锁好。

三、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。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,要养成两眼同睁、双手并用(左手操纵调焦螺旋,右手操纵移片器)的习惯,必要时应一边观察一边计数或绘图记录。如果两眼同睁观察不习惯,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。观察时双眼同睁既可防止眼睛疲劳又方便绘图。

四、操作练习

以血涂片、英文字母装片、红绿羊毛交叉装片或其他标本为材料,严格按照上述操作程序反复练习低倍镜、高倍镜和油镜的使用方法。

1. 血涂片的观察:血涂片上的血膜一般用瑞氏染料染成蓝紫色,故只要将呈蓝紫色的血膜对着通光孔,准焦后即可见到血细胞。

2. 字母装片:取字母装片,先用眼睛直接观察一下字母的方位和大小,然后放到低倍镜下观察。注意视野中字母的方位发生了什么变化?标本移动的方向与视野中物像移动的方向有何不同?

3. 羊毛交叉装片:先在低倍镜下仔细观察找到两根羊毛的交叉点,将交叉点移至视野中央后换高倍镜观察,利用细调螺旋分别对两根羊毛进行准焦,分辨出两根羊毛的上下位置。

作业与思考

1. 使用显微镜观察标本时,为什么必须按从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行?
2. 在调焦时为什么要先将低倍镜与标本表面的距离调节到 6mm 之内?而油镜则先使其贴近标本片表面?
3. 如果标本片放反了,可用高倍镜或油镜找到标本吗?为什么?
4. 怎样才能准确而迅速地在高倍镜或油镜下找到目标?
5. 如果细调螺旋已转至极限而物像仍不清晰,应该怎么办?
6. 如何判断视野中所见到的污点是在目镜上?目镜在显微镜的成像上起什么作用?
7. 在对低倍镜进行准焦时,如果视野中出现了随标本片移动而移动的颗粒或斑纹,是否将标本移至物镜中央,就一定能找到标本的物像?

(赵 刚)

实验二 细胞形态结构与细胞器的观察

【目的要求】

1. 熟悉人体及动物细胞的基本形态结构。
2. 掌握临时玻片标本的制备方法和初步掌握测微尺的使用方法。
3. 进一步掌握光学显微镜的使用方法。
4. 初步掌握光镜下所见细胞、组织结构的绘图记录方法。
5. 熟悉线粒体、高尔基复合体、中心体等几种细胞器在光镜下的形态。

【实验原理】

细胞(cell)是生物体的结构和功能的基本单位。构成人体或其他高等动物体的细胞种类繁多、形态各异,而且这些细胞的形态与其功能往往相适应,如具有收缩功能的肌细胞(muscle cell)呈条形或长梭形;运输 O_2 和 CO_2 的红细胞(erythrocyte, red blood cell, RBC)为双凹圆盘状,便于在血管中流动;具有感受刺激、传导冲动功能的神经细胞(nerve cell)一般附有长短不一的树枝状突起;精子细胞(spermatid)具有一根长长的鞭毛,故很善于运动;巨噬细胞(macrophage)呈不规则形状,能伸出伪足,吞噬和消灭外源的病原微生物。

细胞的体积差别很大,一般来讲,真核细胞的体积要大于原核细胞,高等动物的卵细胞大于体细胞(卵细胞含有较多的营养物质——卵黄)。对于大多数人体及动物的细胞来说,其体积一般在 $20\sim 30\mu m$ 之间,必须借助于光学显微镜才能被观察到。由于细胞体积微小,而且含有较大比例的水,故大多是无色透明的,如果不经染色处理,在显微镜下难以看清细胞的结构。因此,要观察某种细胞时,通常先进行染色处理。在普通光镜下,一般可见人体及动物细胞的基本结构分为细胞膜(cell membrane)、细胞质(cytoplasm)和细胞核(nucleus)等 3 个部分。

细胞中分布有多种具有一定结构与功能的细胞器(organelle);它们有的体积较大,如线粒体(mitochondrion)和高尔基复合体(Golgi complex),可通过不同的染色方法将其在光镜下分别显示出来,这些在光镜下常可见的结构通常称为细胞的显微结构。

【器材与试剂】

1. 器具:显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、牙签、纱布、棉花、吸水纸、剪刀、玻璃缸。
2. 材料:小白鼠、青蛙、人口腔上皮细胞、洋葱、鸡血液、人血液、小鼠精子、兔或猪脊髓、蛙肾小管切片、猫卵巢切片、猫小肠切片、兔或大鼠肝脏切片。
3. 试剂:1%碘液、1%甲苯胺蓝、瑞特染液。
4. 试剂的配制:
 - (1) 1%碘液:称取 1g 碘片和 2g 碘化钾溶于 100ml 80%的乙醇或蒸馏水中即可。
 - (2) 1%甲苯胺蓝:称取 1g 甲苯胺蓝染料末加蒸馏水 100ml 溶解即可。

(3) 瑞特染液:称取 0.1g 瑞特染料(Wright's stain)粉末放入研钵中研细,从 60ml 甲醇中取少许加入研钵中反复研磨,最后加入全部甲醇混匀,装入棕色瓶中保存备用。

【内容与方法】

一、细胞标本的制备及细胞基本形态结构的观察

所有需观察的细胞都应放置到无色透明的载玻片上制备成临时或永久玻片标本后才适于在光镜下观察,在很多情况下,在细胞或组织上还需加盖一张薄而小的玻片——盖玻片,以起到保护标本等作用。

制备玻片标本所用的载玻片和盖玻片要进行清洁,其步骤如下:载玻片先用洗衣粉水刷洗,清水冲洗后,经洗液浸泡 24 小时以上,再用流水充分冲洗,最后烤干备用。对于临时制片所用的载玻片和盖玻片若要求不高也可用揩擦的办法来清洁,即取一张载玻片,用左手拇指和食指夹持载玻片的两端,右手的拇指和食指夹着一块清洁而柔软的布或卫生纸巾,把载玻片放在两手指夹着的布间,然后均匀地前后移动擦净载玻片的两面。盖玻片小而薄,擦时必须小心,把一张盖片平放在左手两手指夹着的布间,并轻轻捏住,右手指夹持盖片的边缘向一个方向转动进行擦拭,用力需轻而均匀。

(一) 洋葱鳞茎表皮细胞的标本制备与观察

1. 标本的制备(表皮细胞装片):取一干净载玻片,在其中央滴一滴 2% 的碘液,将洋葱鳞茎用小刀分为几块,取一块肉质鳞叶,用镊子在其内表面轻轻撕下一小块膜质表皮,剪成约 3~4mm² 的小块,置于载玻片的碘液滴中,铺平,用小镊夹取一干净的盖玻片,将其一侧先接触标本旁的碘液,再缓慢地盖下,以免将空气盖入,产生影响观察的气泡。

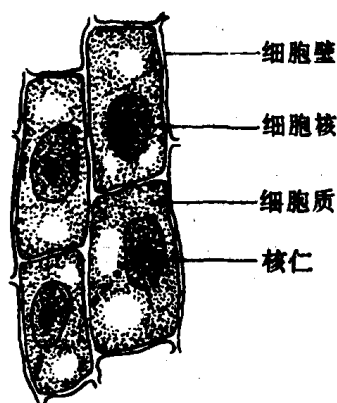


图 2-1 洋葱鳞茎表皮细胞结构

2. 观察:将制备好的装片标本放到显微镜下,先用低倍镜观察,可见许多长柱状排列整齐、彼此相连的细胞,选择其中一个较典型的细胞移至视野中央,再转换高倍镜仔细观察以下结构(图 2-1)。

(1) 细胞壁(cell wall):为细胞最外面的一层由纤维素组成的较厚结构,它是植物细胞的重要特征之一。细胞膜(质膜)位于细胞壁内侧并与其紧密相贴,光镜下不易分辨。

(2) 细胞核:位于细胞中央,呈椭圆形,成熟的细胞由于液泡的挤压,核位于质膜边缘。转动细调螺旋,可见核内有 1~2 个折光较强的

核仁(nucleolus)。

(3) 细胞质:细胞膜与细胞核之间的区域,其中可见一至数个充满液体的小泡,称为液泡(vecuole)。液泡在细胞内呈大小不一的圆形透明区域。

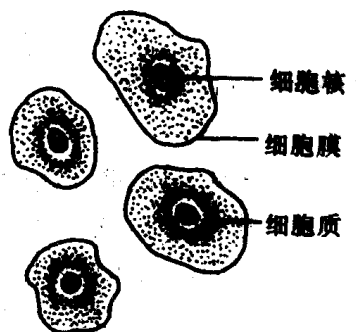


图 2-2 人口腔上皮细胞