

医学实验学系列教材



医学形态技能学

主编 杨庆春 黄林邦



 人民卫生出版社

医学形态技能学

医学形态技能学

主编 李国平 副主编 李国平

医学实验学系列教材

医学形态技能学

主 编 杨庆春 黄林邦

副主编 谢水祥 缪作华 何 珏 陈同强

编 委 (以姓氏笔画为序)

王小丽 邓 婷 邓 晓 朱贤森
刘四君 刘志春 刘波兰 李 娟
何 珏 苏水莲 陈同强 况花荣
张文书 张文平 肖 海 杨庆春
林卡莉 钟有添 袁 娟 黄林邦
黄 真 黄丹丹 曹锦禄 谢水祥
缪作华

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学形态技能学 / 杨庆春, 黄林邦主编. —北京: 人民卫生出版社, 2014

ISBN 978-7-117-18264-5

I. ①医… II. ①杨… ②黄… III. ①医学—生物形态学—医学院校—教材 IV. ①R3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 025093 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

医学形态技能学

主 编: 杨庆春 黄林邦

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 17 插页: 8

字 数: 424 千字

版 次: 2014 年 3 月第 1 版 2014 年 8 月第 1 版第 2 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-18264-5/R · 18265

定 价: 39.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

实验教学是医学教育的重要组成部分,现代医学是在实验生物医学的基础上建立和发展起来的。自从医学教育成为有组织、有规模的课程化教学以来,实验教学就兼有验证学科理论和进行技能训练的功能,但实验教学模式却一直作为学科的附属部分,依附于医学各学科,按学科设置实验室,并以课程为单位组织教学;在实验教学内容上,多以验证基础理论为主要目的,强调课程自身的完整性和系统性,而相关学科的实验则缺少交叉融合,实验内容单一,医学前沿技术得不到及时的补充和应用,并且常常出现不必要的低水平重复现象;在教学方法上则以灌输式、示教式为主,学生依样画葫芦,实验效率低,等等。随着医学科学的迅猛发展和医学模式的转变,特别是生物医学实验技术的飞速发展,传统的医学实验教学模式的弊端已经凸显出来,这使得学生的实践基本技能和科研能力得不到系统、科学、完整和阶梯性的训练,不利于学生综合实践能力、创新能力的培养及个性发展。

顺应时代发展的需要,尝试进行了临床医学专业实验课程改革。其总体目标和基本思路是:遵循科学发展和教育教学规律,依据国际医学教育标准和中国本科医学教育标准,以及经济社会发展对医学人才培养提出的新要求和专业培养目标,以加强医学生基本技能、专业应用技能和综合应用技能的训练,提高医学生实践工作技能、创新能力和科学素质为根本宗旨,对传统的医学实验教学模式进行带有根本性的比较全面的改革,大胆探索一种全新的医学实验教学体系,构建与理论教学既相对独立,又相互联系、相互渗透的医学实验课程;编写出版一套以反映医学本科教育阶段系统培养学生实践技能为主要内容的医学实验教材;寻求实验教学一体化综合实践训练的教学模式,并通过试运行逐步加以完善。

在实验教学改革大潮的推动下,我们依据医学实验教学的培养目标和构建实验教学体系的原则,构建了《医学实验学》系列化实验技术课程,编写了这套《医学实验学》系列化教材。全套教材包括《医学科研方法概论》、《医学形态技能学》、《医学机能技能学》、《医学分析与检测技能学》、《医学临床基本技能学》五个分册,各分册既有实验基础理论和基本知识的讲授,又有实验技术操作,但以实验技术操作与基本技能训练为主;同时,各部分规定了明确的教学目标,并可依据其教学目标,建立起不同类型的实验教学单元,每个单元可由若干个实验项目组成。各部分的教学目标和基本内容是:

《医学科研方法概论》:基于科学方法论,以医学科学研究的基本理论与方法为主线,立足于构建适合医学本科层次的医学科研方法学知识体系,其内容主要有:医学科研的基本特性、类型与程序;医学科研方法学的概念、内容,以及医学科研中的一般研究方法和思维方式;医学科研设计的基本内容、要素与原则;医学实验设计的基本原则和基本方法;医学

实验动物与动物实验的基本操作；临床医学研究设计与方法；医学科研资料的统计学处理；医学文献检索、医学论文写作、科研成果的鉴定与评价等。它是医学科学研究的入门课程和实验教学的基础部分。其教学目标是：使学生初步认识医学科学研究的概貌，初步掌握医学实验研究的基础理论、基本知识和基本方法，培养学生的科学态度和科学思维能力，为学生架起一座从理论到实践的桥梁。

《医学形态技能学》：以人体和病原生物的形态结构为主线，其内容主要以组织胚胎学、病理学、医用微生物学、人体寄生虫学和诊断学中的“骨髓细胞学检查”等内容为基础，构建包括形态学实验技术总论、组织病理学实验技术、病原生物学实验技术等几部分内容。其教学目标是：使学生初步掌握形态实验技术的基本技能，熟悉形态观察与描述的基本知识，提高对各种形态的观察力和辨析力。

《医学机能技能学》：以人体机能及其变化为主线，以生理学、病理生理学、药理学等内容为基础，构建成包括机能学实验技术总论、机能学基本技能训练、综合创新技能训练等从基础 - 能力 - 提高三个层次的内容体系。它是医学实验研究的基本手段，其教学目标是：使学生掌握基本的技术方法和规范的基本操作技能，掌握实验原理和常规仪器的工作原理、主要技术参数及其意义，并能对实验结果进行正确的分析，得出科学的结论，从而初步完成对医学生科研能力的全程训练。

《医学分析与检测技能学》：以常用分析与检测实验技术为主线，以医用化学、生物化学与分子生物学、医学免疫学、医学遗传学等学科内容为基础，并将诊断学和临床各科的“实验诊断”中的常用检验诊断技术相关实验内容划归本分册。其主要内容有常用医学分析与检测实验技术、常用分析与检测仪器与基本实验、综合性实验等。其教学目标是：使学生初步掌握常用分析与检测实验技术的基本知识和基本技能，常规仪器设备的使用和保养，了解现代分子生物学技术的基本知识，熟悉各种检测指标的临床意义。

《医学临床基本技能学》：以临床基本技能和基本操作为主线，以诊断学和外科总论的内容为基础，将妇产科学、麻醉科学、眼耳鼻喉科学和儿科学所特有的临床基本操作技能归入这部分。其教学目标是：使学生在进入临床实习前受到系统而规范的临床基本操作和技能的训练，掌握临床诊断的理论原则和思维方法，熟悉其工作程序；能独立进行系统的病史采集和规范的体格检查，书写规范的完整病历和病历摘要；能初步掌握心电图机的操作和心电图的图形分析，了解常用影像学检查结果的临床意义；掌握无菌术、外科手术的基本技术和技能等。

此外，各分册还构建了学科间相互交叉的综合性或设计性实验项目，以强化医学生科研能力的全程训练，检验学生运用所学知识进行观察、分析和解决问题的能力。

本教材在编写过程中得到了许多专家、教授的大力支持，并承担各部分的主编、审校任务和主要章节的编写工作；编辑委员会的同志为教材的统稿、定稿和编辑、出版做了大量的工作，使全套教材能够如期与学生见面。在此，我们向为本教材的出版作出贡献的所有同志表示诚挚的谢意！

由于本教材涉及面广，参考资料多，在编写过程中未能将主要参考文献一一列出，敬请有关作者谅解，并向他们致以崇高的敬意和衷心的感谢！

编写出版《医学实验学》系列化教材是我校深化实验教学改革中的一个大胆尝试,随着医学模式的转变和现代医学科学的蓬勃发展,医学科学研究的内容和方法也将不断地更新和发展;加之本教材涵盖的学科广,参编人员多,编写时间紧,特别是编者水平有限,理解不深,因此,在教材中难免有谬误和不足之处,欢迎广大教师和读者提出宝贵意见,我们将不胜感谢!

医学实验学系列教材编写组

2013年12月

目 录

第一篇 总 论

第一章 组织病理学实验技术	1
第一节 显微镜技术	1
一、光学显微镜	1
二、电子显微镜	3
第二节 组织病理学常用技术	5
一、组织学切片制作技术	5
二、组织病理学特殊染色与组织化学技术	12
第三节 免疫组织化学技术及其他技术简介	19
一、免疫组织化学概述	19
二、免疫组织化学技术的发展概况	21
三、免疫组织化学常用的抗体标记物	23
四、其他技术介绍	30
第二章 病原生物学常用技术	33
第一节 微生物学常用技术	33
一、病毒组织培养法(原代细胞单层培养)	33
二、核酸分子杂交技术——斑点杂交法检测 HBV DNA	34
三、临床标本的微生物学检查	36
第二节 医学寄生虫学检测技术	39
一、虫卵检查方法	39
二、蛔虫检查方法	39
三、血片制作及瑞氏染色	40
四、溶组织内阿米巴培养(洛克液营养琼脂双相培养基法)	41

第二篇 组织病理学实验

第一章 细胞、组织学总论	43
第一节 组织病理学实验基础与要求	43
一、普通光学显微镜的结构与使用	43

二、实验报告书写和绘图基本要求	46
三、常用试剂的配制	46
第二节 动、植物细胞的有丝分裂	49
实验一 动、植物细胞的有丝分裂	49
第三节 组织学总论	51
实验二 上皮组织	51
实验三 结缔组织	53
实验四 神经组织	56
实验五 肌组织	58
实验六 皮肤	59
实验七 免疫系统	61
第四节 人体胚胎学概论	63
实验八 人体胚胎早期发生	64
第二章 病理学总论	67
第一节 细胞和组织的适应、损伤与修复	67
实验九 细胞和组织的适应、损伤与修复	67
第二节 局部血液循环障碍	70
实验十 局部血液循环障碍	70
第三节 炎症	74
实验十一 炎症	74
第四节 肿瘤	78
实验十二 肿瘤	78
第三章 系统器官的组织病理学实验	86
第一节 循环系统组织学与心血管系统疾病	86
实验十三 循环系统组织学	86
实验十四 心血管系统疾病	88
第二节 呼吸系统组织学与疾病	93
实验十五 呼吸系统组织学	93
实验十六 呼吸系统疾病	95
第三节 消化系统组织学与疾病	100
实验十七 消化管组织学	100
实验十八 消化腺组织学	103
实验十九 消化系统疾病	106
第四节 泌尿系统组织学与疾病	110
实验二十 泌尿系统组织学	110
实验二十一 泌尿系统疾病	112
第五节 生殖系统组织学与疾病	116
实验二十二 生殖系统组织学	116

实验二十三 生殖系统与乳腺疾病·····	120
第六节 内分泌系统组织学与疾病·····	125
实验二十四 内分泌系统组织学·····	125
实验二十五 内分泌系统疾病·····	127
第七节 淋巴造血系统疾病·····	130
实验二十六 淋巴造血系统疾病·····	130
第八节 神经系统疾病·····	132
实验二十七 神经系统疾病·····	132
第九节 传染病与寄生虫病·····	135
实验二十八 传染病·····	135
实验二十九 寄生虫病·····	139
第四章 组织病理学综合开放、设计性实验 ·····	142
第一节 组织学综合开放、设计性实验·····	142
实验三十 血液涂片的制作与观察·····	142
实验三十一 鸡胚培养与制片·····	144
第二节 病理学综合开放、设计性实验·····	146
实验三十二 活体组织检材的病理诊断·····	146
实验三十三 家兔主要脏器糖原染色的观察·····	146
第三篇 病原生物学实验	
第一章 医学微生物学实验 ·····	149
第一节 细菌学总论·····	149
实验一 细菌形态结构及运动的观察·····	149
实验二 细菌涂片标本的制作及革兰染色法·····	151
实验三 基础培养基的制备·····	152
实验四 细菌的接种和培养方法·····	154
实验五 细菌呼吸酶及细菌代谢产物的检查·····	157
实验六 细菌的分布·····	162
实验七 消毒、灭菌与除菌法·····	163
实验八 噬菌体·····	168
实验九 细菌的变异·····	170
实验十 细菌内毒素和外毒素的检测·····	174
第二节 细菌各论·····	175
实验十一 病原性球菌的形态观察·····	175
实验十二 病原性球菌的培养特性观察·····	176
实验十三 病原性球菌的胞外酶试验·····	177
实验十四 抗“O”试验·····	178
实验十五 肠道杆菌的培养·····	179

实验十六	产毒大肠埃希菌不耐热肠毒素的检测	180
实验十七	肥达反应	180
实验十八	霍乱弧菌及厌氧性细菌	181
实验十九	产气荚膜杆菌的卵磷脂酶试验	182
实验二十	放线菌的形态及培养观察	182
实验二十一	动物源性细菌及其他细菌的形态及培养观察(示教)	183
实验二十二	流行性感冒杆菌的卫星试验	183
实验二十三	空肠弯曲菌的微需氧培养实验	184
实验二十四	白喉杆菌	184
实验二十五	分枝杆菌属	187
第三节	真菌学实验	189
实验二十六	真菌的形态结构观察	190
实验二十七	真菌菌落特征观察	190
实验二十八	真菌小培养及染色标本的制作	191
实验二十九	真菌感染的检查方法	192
第四节	病毒学实验	194
实验三十	病毒的形态观察	194
实验三十一	病毒的分离培养	194
实验三十二	病毒感染细胞的观察	197
实验三十三	病毒血凝和血凝抑制试验	199
实验三十四	乙型肝炎病毒抗原抗体系统的检测	200
实验三十五	HIV 病毒抗体蛋白印迹法确证试验	206
第二章	人体寄生虫学	209
第一节	吸虫	209
实验三十六	华支睾吸虫、布氏姜片吸虫、卫氏并殖吸虫	209
实验三十七	裂体吸虫(日本血吸虫)	211
第二节	绦虫	214
实验三十八	曼氏迭宫绦虫、链状带绦虫(猪带绦虫)、肥胖带吻绦虫 (牛带绦虫)	214
第三节	线虫	216
实验三十九	蛔虫、钩虫	216
实验四十	鞭虫、蛲虫、粪类圆线虫	220
实验四十一	丝虫、旋毛虫、广州管圆线虫	222
第四节	原虫	224
实验四十二	溶组织内阿米巴、结肠内阿米巴、蓝氏贾第鞭毛虫、阴道毛滴虫、 杜氏利什曼原虫	224
实验四十三	疟原虫、刚地弓形虫	228
第五节	医学节肢动物	232
实验四十四	昆虫纲(蚊、蝇、蚤、虱)	232

实验四十五 蛛形纲(恙螨、疥螨、蠕形螨)	235
第三章 病原生物学综合开放、设计性实验与病例讨论	237
第一节 医学微生物学综合开放、设计性实验	237
实验四十六 临床常见标本的检查	237
实验四十七 设计性实验	249
第二节 寄生虫学综合开放性实验与病例讨论	250
实验四十八 溶组织内阿米巴有菌培养及检查	250
实验四十九 寄生虫病例讨论	251
参考文献	260

第一篇 总论

第一章

组织病理学实验技术

第一节 显微镜技术

显微镜是观察细胞的主要工具。根据光源不同,可分为光学显微镜和电子显微镜两大类。前者以可见光(紫外线显微镜以紫外光)为光源,后者则以电子束为光源。

一、光学显微镜

(一) 普通光学显微镜

普通生物显微镜由3部分构成即:①照明系统,包括光源和聚光器;②光学放大系统,由物镜和目镜组成,是显微镜的主体,为了消除球差和色差,目镜和物镜都由复杂的透镜组构成;③机械装置,用于固定材料和观察方便。

显微镜物象是否清楚不仅决定于放大倍数,还与显微镜的分辨力(resolution)有关,分辨力是指显微镜(或人的眼睛距目标25cm处)能分辨物体最小间隔的能力,分辨力的大小决定于光的波长和镜口率以及介质的折射率,用公式表示为:

$$R = 0.61\lambda / N.A. \dots\dots\dots 1$$

$$N.A. = n \sin(\alpha/2)$$

式中: n = 介质折射率; α = 镜口角(标本对物镜镜口的张角), $N.A.$ = 镜口率(numeric aperture)。镜口角总是要小于 180° , 所以 $\sin(\alpha/2)$ 的最大值必然小于1。各种介质的折射率见表1-1-1。

表 1-1-1 介质的折射率

介质	空气	水	香柏油	α 溴萘
折射率	1	1.33	1.515	1.66

制作光学镜头所用的玻璃折射率为1.65~1.78,所用介质的折射率越接近玻璃的越好。对于干燥物镜来说,介质为空气,镜口率一般为0.05~0.95;油镜头用香柏油为介质,镜口率可接近1.5。

普通光线的波长为400~700nm,因此显微镜分辨力数值不会小于0.2 μ m,人眼的分辨力是0.2mm,所以一般显微镜设计的最大放大倍数通常为1000 \times 。

(二) 荧光显微镜

细胞中有些物质,如叶绿素等,受紫外线照射后可发荧光;另有一些物质本身虽不能发

荧光,但如果用荧光染料或荧光抗体染色后,经紫外线照射亦可发荧光,荧光显微镜就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一。

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。

(三) 激光共聚焦扫描显微镜

激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scanning microscope)用激光作扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以共聚焦激光扫描显微镜有较高的分辨力,大约是普通光学显微镜的3倍。系统经一次调焦,扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不一样时,就可以获得样品不同深度层次的图像,这些图像信息都存储于计算机内,通过计算机分析和模拟,就能显示细胞样品的立体结构。

激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量。

(四) 暗视野显微镜

在日常生活中,室内飞扬的微粒灰尘是不易被看见的,但在暗的房间中若有一束光线从门缝斜射进来,灰尘便粒粒可见了,这是光学上的丁达尔现象。暗视野显微镜(dark field microscope)就是利用此原理设计的。它的结构特点主要是使用中央遮光板或暗视野聚光器,常用的是抛物面聚光器,使光源的中央光束被阻挡,不能由下而上地通过标本进入物镜。从而使光线改变途径,倾斜地照射在观察的标本上,标本遇光发生反射或散射,散射的光线投入物镜内,因而整个视野是黑暗的。在暗视野中所观察到的是被检物体的衍射光图像,并非物体的本身,所以只能看到物体的存在和运动,不能辨清物体的细微结构。但被检物体为非均质时,并大于 $1/2$ 波长,则各级衍射光线同时进入物镜,在某种程度上可观察物体的构造。一般暗视野显微镜虽看不清物体的细微结构,但却可分辨 $0.004\mu\text{m}$ 以上的微粒的存在和运动,这是普通显微镜(最大的分辨力为 $0.2\mu\text{m}$)所不具有的特性,可用于观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等。

(五) 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)由P. Zernike于1932年发明,并因此获1953年诺贝尔物理奖。这种显微镜最大的特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。相差显微镜的基本原理是,把透过标本的可见光的光程差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,同时被延迟了 $1/4\lambda$ (波长),如果再增加或减少 $1/4\lambda$,则光程差变为 $1/2\lambda$,两束光合轴后干涉加强,振幅增大或减小,提高反差。在构造上,相差显微镜有不同于普通光学显微镜的两个特殊之处:

1. 环形光阑(annular diaphragm) 位于光源与聚光器之间,作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥,聚焦到标本上。

2. 相位板(annular phase plate) 在物镜中加了涂有氟化镁的相位板,可将直射光或衍射光的相位推迟 $1/4\lambda$ 。分为两种:A+相板:将直射光推迟 $1/4\lambda$,两组光波合轴后光波相加,振幅加大,标本结构比周围介质更加变亮,形成亮反差(或称负反差)。B+相板:将衍射光

推迟 $1/4\lambda$, 两组光线合轴后光波相减, 振幅变小, 形成暗反差(或称正反差), 结构比周围介质更加变暗。

(六) 偏光显微镜

偏光显微镜(polarizing microscope)用于检测具有双折射性的物质, 如纤维丝、纺锤体、胶原、染色体等。和普通显微镜不同的是: 其光源前有偏振片(起偏器), 使进入显微镜的光线为偏振光, 镜筒中有检偏器(一个偏振方向与起偏器垂直的偏振片), 这种显微镜的载物台是可以旋转的, 当载物台上放入单折射的物质时, 无论如何旋转载物台, 由于两个偏振片是垂直的, 显微镜里看不到光线, 而放入双折射性物质时, 由于光线通过这类物质时发生偏转, 因此旋转载物台便能检测到这种物体。

(七) 微分干涉差显微镜

1952年, Nomarski 在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉差显微镜(differential interference contrast microscope, DIC 显微镜)。DIC 显微镜又称 Nomarski 相差显微镜(Nomarski contrast microscope), 其优点是能显示结构的三维立体投影影像。与相差显微镜相比, 其标本可略厚一点, 折射率差别更大, 故影像的立体感更强。

DIC 显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜, 技术设计要复杂得多。DIC 利用的是偏振光, 有四个特殊的光学组件: 偏振器(polarizer)、DIC 棱镜、DIC 滑行器和检偏器(analyzer)。偏振器直接装在聚光系统的前面, 使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了石英 Wollaston 棱镜, 即 DIC 棱镜, 此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光(x 和 y), 二者成一小夹角。聚光器将两束光调整成与显微镜光轴平行的方向。最初两束光相位一致, 在穿过标本相邻的区域后, 由于标本的厚度和折射率不同, 引起了两束光发生了光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个 Wollaston 棱镜, 即 DIC 滑行器, 它把两束光波合并成一束。这时两束光的偏振面(x 和 y)仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置, 即检偏器。在光束形成目镜 DIC 影像之前, 检偏器与偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光, 从而使二者发生干涉。x 和 y 波的光程差决定着透光的多少。光程差值为 0 时, 没有光穿过检偏器; 光程差值等于波长一半时, 穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上, 标本结构呈现出亮暗差。为了使影像的反差达到最佳状态, 可通过调节 DIC 滑行器的纵行微调来改变光程差, 光程差可改变影像的亮度。调节 DIC 滑行器可使标本的细微结构呈现出正或负的投影形象, 通常是一侧亮, 而另一侧暗, 这便造成了标本的人为三维立体感, 类似大理石上的浮雕。

DIC 显微镜使细胞的结构, 特别是一些较大的细胞器, 如核、线粒体等, 立体感特别强, 适合于显微操作。目前像基因注入、核移植、转基因等的显微操作常在这种显微镜下进行。

(八) 倒置显微镜

组成和普通显微镜一样, 只不过物镜与照明系统颠倒, 前者在载物台之下, 后者在载物台之上, 用于观察培养的活细胞, 具有相差物镜。

进入 20 世纪 80 年代以来, 光学显微镜的设计和制作又有了很大的发展, 其发展趋势主要表现在, 注重实用性和多功能方面的改进。在装配设计上趋于采用组合方式, 集普通光镜加相差、荧光、暗视野、DIC、摄影装置于一体, 从而操作灵活, 使用方便。

二、电子显微镜

(一) 透射电子显微镜

1. 基本原理 在光学显微镜下无法看清小于 $0.2\mu\text{m}$ 的细微结构, 这些结构称为亚显微

结构(submicroscopic structures)或超微结构(ultramicroscopic structures; ultrastructures)。要想看清这些结构,就必须选择波长更短的光源,以提高显微镜的分辨率(表 1-1-2)。1932年, Ruska 发明了以电子束为光源的透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),电子束的波长要比可见光和紫外光短得多,并且电子束的波长与发射电子束的电压平方根成反比,也就是说,电压越高波长越短。目前 TEM 的分辨力可达 0.2nm。

表 1-1-2 不同光源的波长

光波名称	可见光	紫外光	X 射线	α 射线	电子束	
					0.1kV	10kV
波长(nm)	390~760	13~390	0.05~13	0.005~1	0.123	0.0122

电子显微镜与光学显微镜的成像原理基本一样,所不同的是前者用电子束作光源,用电磁场作透镜。另外,由于电子束的穿透力很弱,因此用于电镜的标本须制成厚度约 50nm 左右的超薄切片。这种切片需要用超薄切片机(ultramicrotome)制作。电子显微镜的放大倍数最高可达近百万倍,由电子照明系统、电磁透镜成像系统、真空系统、记录系统、电源系统等 5 部分构成。

2. 制样技术

(1) 超薄切片:通常以锇酸和戊二醛固定样品,以环氧树脂包埋,以热膨胀或螺旋推进的方式推进样品切片,切片厚度 20~50nm,切片采用重金属盐染色,以增大反差。

(2) 负染技术:负染就是用重金属盐(如磷钨酸、醋酸双氧铀)对铺展在载网上的样品进行染色;吸去染料,样品干燥后,样品凹陷处铺了一薄层重金属盐,而凸出的地方则没有染料沉积,从而出现负染效果,分辨力可达 1.5nm 左右。

(3) 冰冻蚀刻:冰冻蚀刻(freeze-etching)亦称冰冻断裂(freeze-fracture)。标本置于 -100°C 的干冰或 -196°C 的液氮中进行冰冻,然后用冷刀骤然将标本断开,升温后,冰在真空条件下迅即升华,暴露出断面结构,称为蚀刻(etching)。蚀刻后,向断面以 45° 角喷涂一层蒸汽铂,再以 90° 角喷涂一层碳,加强反差和强度,然后用次氯酸钠溶液消化样品,把碳和铂的膜剥下来,此膜即为复膜(replica)。复膜显示出了标本蚀刻面的形态,在电镜下得到的影像即代表标本中细胞断裂面处的结构。

(二) 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)于 20 世纪 60 年代问世,用来观察标本的表面结构。其工作原理是用一束极细的电子束扫描样品,在样品表面激发出次级电子,次级电子的多少与电子束入射角有关,也就是说与样品的表面结构有关,次级电子由探测体收集,并在那里被闪烁器转变为光信号,再经光电倍增管和放大器转变为电信号来控制荧光屏上电子束的强度,显示出与电子束同步的扫描图像。图像为立体形象,反映了标本的表面结构。为了使标本表面发射出次级电子,标本在固定、脱水后,要喷涂上一层重金属微粒,重金属在电子束的轰击下发出次级电子信号。

目前扫描电镜的分辨力为 6~10nm,人眼能够区别荧光屏上两个相距 0.2mm 的光点,则扫描电镜的最大有效放大倍率为 $0.2\text{mm}/10\text{nm}=20\,000\times$ 。

(三) 扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)由 Binnig 等于 1981 年发明,根据量子力学原理中的隧道效应而设计。当原子尺度的针尖在不到一个纳米的高度上扫描样

品时,此处电子云重叠,外加一电压(2mV~2V),针尖与样品之间产生隧道效应而有电子逸出,形成隧道电流。电流强度和针尖与样品间的距离有函数关系,当探针沿物质表面按给定高度扫描时,因样品表面原子凹凸不平,使探针与物质表面间的距离不断发生改变,从而引起电流不断发生改变。将电流的这种改变图像化即可显示出原子水平的凹凸形态。扫描隧道显微镜的分辨率很高,横向为0.1~0.2nm,纵向可达0.001nm。它的优点是三态(固态、液态和气态)物质均可进行观察,而普通电镜只能观察制作好的固体标本。

利用扫描隧道显微镜直接观察生物大分子,如DNA、RNA和蛋白质等分子的原子布阵,和某些生物结构,如生物膜、细胞壁等的原子排列。

(陈同强)

第二节 组织病理学常用技术

一、组织学切片制作技术

(一) 组织学切片制作方法

组织切片的制作方法有:石蜡切片、冷冻切片、明胶冷冻切片、火棉胶切片、振动切片、超薄切片等。

石蜡切片是最常用的方法。组织经固定液的固定,经系列酒精的脱水,经透明剂的作用,经熔化的石蜡的浸渍,包埋后所切成的切片,称石蜡切片。本节将较详细讲授其制作步骤。

冷冻切片具有手续简单,制片速度快,并能完整保存细胞结构及生物大分子活性(脂肪、酶等)的优点。但也有切片较厚,容易破损,染色不清晰等缺点,为了避免这些缺点,可在切片前,先行明胶包埋。

火棉胶切片通常用于制作较大组织块(如眼球、脑)的切片。

振动切片方法简单、快速,能使活细胞损伤较小、组织比较完整保留,适合做新鲜组织切片和组织电生理学等研究。

用超薄切片机可制备50~100nm超薄切片和500~2000nm半薄切片,供电镜和显微镜观察。

组织切片制作方法的基本程序为:取材→固定→水洗→脱水→透明→浸蜡→包埋→切片→贴片→染色→封闭(图1-1-1)。

(二) 石蜡切片的制作方法 with 染色

1. 取材 组织标本主要取之于活组织检查标本、手术切除标本、动物模型标本以及尸体解剖标本等。组织学教学切片标本当然以人的材料为佳,但正常而又新鲜的人的材料很难得,有时可采用结构相似的动物组织来满足教学制片的需要;科研工作往往用动物模型标本。目前广泛采用的有猫、狗、猴、兔、豚鼠、大白鼠、小白鼠以及青蛙等;病理检材通常是活组织检查标本、手术切除标本以及尸体解剖标本等。

组织取材时应注意:

(1) 所取材料越新鲜越好:最好在心脏还在跳动时立即进行取材,马上投入固定液。在所有组织中,消化管中的大、小肠要特别优先处理,因其黏膜面的上皮组织极易产生自溶。