

能力培养型生物学基础课系列实验教材

# 细胞生物学实验教程

安利国 主编

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面上设置实验项目,突出综合能力和创新能力的培养。基础性实验包括细胞形态与结构的观察技术、细胞化学、细胞膜生理、细胞增殖与染色体制备技术、细胞培养等内容,共计21个实验,是细胞学的最基本、最代表本学科特点的实验方法和技术。综合性实验包括细胞器的分离与观察、纺锤体的免疫荧光标记、免疫荧光方法显示植物细胞的微管、人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备、染色体分带技术、传代细胞培养及其增殖动力学检测、细胞融合和细胞凋亡等8个实验,是多技术和多层次的综合性实验,实验难度较大。本书还提供了8个研究性实验题目供学生开展创新性实验时参考。

本书是大学本科细胞生物学基础实验教材,适用于综合性大学、师范院校、农林院校和医学院校生物科学、生物技术及其相关专业的学生使用,也可供其他专业人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

---

细胞生物学实验教程/安利国主编. —北京:科学出版社,2004  
能力培养型生物学基础课系列实验教材

ISBN 7-03-014202-0

I .细... II .安... III .细胞生物学-实验-高等学校-教材  
IV .Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第084866号

---

责任编辑:陈 露 谭宏宇 / 责任校对:连秉亮  
责任印制:刘 学 / 封面设计:一 明

**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>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2004年9月第一版 开本:B5(720×1000)

2005年9月第二次印刷 印张:8

印数:3201~6500 字数:144000

定价:12.80元

# 能力培养型生物学基础课系列实验教材编委会

主任委员：安利国（山东师范大学）

副主任委员：刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

郭善利（聊城大学）

委员：（按姓氏笔画为序）

付荣恕（山东师范大学）

艾洪滨（山东师范大学）

刘 箭（山东师范大学）

刘林德（烟台师范学院）

刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

安利国（山东师范大学）

杨 革（曲阜师范大学）

侯福林（山东师范大学）

赵遵田（山东师范大学）

郭善利（聊城大学）

## 《细胞生物学实验教程》编写人员

主 编：安利国

副主编：邢维贤 尹 苗

编 者：(按姓氏笔画为序)

尹 苗 闫华超 安利国 孙纳新

刘 林 孙振兴 邢维贤 邱 军

李学红 杨桂文 徐承水 崔龙波

## 出版说明

生物科学是一门实验性学科,实验教学在其专业课学习中占有十分重要的地位,动手能力、综合分析能力和创新能力的培养主要依靠实验教学来完成。

受传统教育思想的影响,几十年来我国高等师范院校生物科学专业的实验教学以学科知识为体系,从属于理论教学,以验证理论知识和学习实验技术为主要目的,忽视了能力的培养,扼杀了学生的创新欲望。实验内容繁琐,存在大量低水平的重复,远远不能适应创新型人才培养的要求。

近年来,随着创新人才教育的开展,能力的培养已引起国家和学校的普遍重视。高教部下发的《关于加强高等学校本科教学工作,提高教学质量的若干意见》中特别强调“进一步加强实践教学,注重学生创新精神和实践能力的培养”,其中指出:“实践教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。高等学校要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验。”但是,与此相适应的教材却很少,尤其是针对生物科学基础实验的系列教材未见出版。本套能力培养型实验教材就是适应我国高等教育创新性人才培养的需要而编写的。

本套教材将实验分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三种类型。

基础性实验是经过精选的最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验由多种实验手段与技术和多层次的实验内容所组成,要求学生独立完成预习报告、试剂配制、仪器安装与调试、实验记录、数据处理和总结报告。综合性实验主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、对实验的独立工作能力、对实验结果的综合分析能力,为研究性实验的顺利开展做好准备。

研究性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,以相应学科的研究为主结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。部分优秀课程研究论文可进一步深化、充实,作为毕业论文参加答辩。

三种类型实验所占比例根据不同年级、不同课程而确定。低年级课程以基础性实验为主,基础性、综合性 and 研究性实验的比例为 7:2:1。随年级升高,逐渐增加综合性和研究性实验的比例,基础性、综合性和研究性实验的比例达到

5:3:2。

本套教材试图从下述几个方面有所突破和创新：

1. 以能力培养为核心,通过综合性实验和研究性实验的开设,启发学生思维,引导学生创新。

2. 本套教材是我国高校第一套生物科学基础实验课系列性教材,在编委会的统一领导下完成,避免了低层次重复,体现了实验内容的系统性。

3. 本套教材特别强调实用性和可操作性,实验内容在编写单位已经经过了2~3遍的试用。

4. 本套教材充分体现先进性,尽可能反映生命科学的最新进展。

5. 每本教材都附有实验报告和研究论文范文,为学生提供了实验报告的规范性样板,对培养学生严谨、仔细的学风具有一定的指导作用。

6. 本套教材已着手制作电子光盘版,使之成为立体化教材。多数实验将配有录像和多媒体课件,用于实验之前播放,指导学生的实验操作。

尽管各位主编和编委已经尽了最大努力,但是,由于编者水平所限,肯定会有不少的错误,恳请各位同仁不吝赐教,以便再版时减少谬误。

本套教材得到国家教育部《面向二十一世纪,我国生物教育专业的培养目标、培养方案和课程体系的研究》和山东省高校生物科学(师范类)改革试点专业专项经费的资助,承蒙山东师范大学和科学出版社的领导与老师的大力支持,在此一并感谢。

安利国

2004年8月

# 前 言

细胞生物学是一门实验性学科,其诞生和发展是以实验仪器的发明和实验技术的改进为基础的。如果没有显微镜的发明,人们用肉眼不可能发现体积小于人眼分辨率 10 倍的如此微小的细胞;如果没有各种细胞染色技术的产生,人们不可能观察到无色透明的细胞内的显微结构;如果没有电子显微镜的出现,人们不可能了解细胞内部的超微结构;如果没有显微操作技术的成熟,人们不可能制造出克隆动物。因此,细胞学实验在细胞生物学的教学中占有十分重要的位置,它不仅有助于学生对细胞学知识与理论的学习和理解,同时,对培养学生的细胞学研究与创新能力也至关重要。

以往的细胞学实验教学过分注重实验技术的训练,忽略了学生能力的培养。实验开设了不少,但是,学生对基本的细胞学实验技术并不能真正把握,对所学的实验技术在科学研究中的用途更缺乏体会和理解。为了适应创新人才培养的需要,本书在实验内容的设置上作了大胆的尝试,从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层面上设置实验项目,突出综合能力和创新能力的培养。基础性实验包括细胞形态与结构的观察技术、细胞化学、细胞膜生理、细胞增殖与染色体制备技术、细胞培养等 5 章内容,共计 21 个实验,是细胞学的最基本、最代表本学科特点的实验方法和技术。基础性实验强调基本技术的学习和基本技能的训练,应特别注意学生的实验规范和实验习惯的养成。综合性实验包括细胞器的分离与观察、纺锤体的免疫荧光标记、免疫荧光方法显示植物细胞的微管、人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备、染色体分带技术、传代细胞培养及其增殖动力学检测、细胞融合和细胞凋亡等 8 个实验,它们都是在基础性实验基础上的多技术和多层次的综合实验,实验难度较大。综合性实验强调基本技术的综合运用,应特别注意学生综合能力的培养。研究性实验是在教师的指导下,学生自己设计题目,独立开展实验,重点培养学生的创新意识和创新能力。因此,不可能为同学们提供现成的实验研究方案,否则,就无创新可言。本书提供的 8 个研究性实验题目是以编者所在单位的教学与研究为基础、考虑到细胞学基本实验技术和学生科研能力的实际而提出的几个研究方面,局限性很大,只是想起到抛砖引玉、启发学生思维的作用,各校要根据自己的实际开拓新的价值更大的研究项目,每位学生也要展开想像的翅膀,大胆设想,广泛搜集资料,周密设计方案,独立开展研究。相信同学们

一定会有所突破,有所创新,在细胞生物学实验研究中,获得创造与成功的喜悦,体验科学研究的艰辛。

本书编写力求少而精,但是,由于作者水平所限,内容仍显冗杂,且多有谬误,敬请各校在使用时酌情选用,批评指正。编写过程中参阅了国内外同行的大量资料,得到了众多师长朋友的帮助,尤其是山东师范大学冯静仪教授曾经为本书中的不少基础实验的开设和改进做了大量的工作,值本书付梓之际,深表谢忱。

编者  
2004年8月

# 目 录

出版说明  
前言

## 第一部分 基础性实验

第一章 细胞形态与结构的观察技术·····	( 1 )
实验 1 普通光学显微镜的结构及使用·····	( 2 )
实验 2 血涂片的制备和细胞大小的测量·····	( 11 )
实验 3 石蜡切片的制作及 HE 染色·····	( 13 )
实验 4 特殊显微镜的使用·····	( 17 )
实验 5 激光扫描共聚焦显微镜的原理与使用·····	( 22 )
实验 6 透射式电子显微镜的原理与使用·····	( 25 )
实验 7 扫描电子显微镜的结构、原理及样品制备·····	( 30 )
第二章 细胞化学·····	( 32 )
实验 8 脂类的细胞化学·····	( 32 )
实验 9 核酸的细胞化学·····	( 35 )
实验 10 糖类的细胞化学·····	( 39 )
实验 11 蛋白质的细胞化学·····	( 42 )
实验 12 酶的细胞化学·····	( 44 )
第三章 细胞膜生理·····	( 50 )
实验 13 细胞膜的通透性·····	( 50 )
实验 14 植物凝集素对红细胞的凝集作用·····	( 52 )
实验 15 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬实验·····	( 53 )
实验 16 死活细胞鉴别·····	( 54 )
第四章 细胞增殖与染色体制备技术·····	( 56 )
实验 17 有丝分裂·····	( 56 )
实验 18 减数分裂·····	( 57 )
实验 19 动物骨髓细胞染色体标本的制备·····	( 60 )
实验 20 植物根尖染色体标本的制备·····	( 62 )

第五章 细胞培养	(64)
实验 21 原代培养	(65)

## 第二部分 综合性实验

实验 22 细胞器的分离与观察	(69)
实验 23 纺锤体的免疫荧光标记	(71)
实验 24 免疫荧光方法显示植物细胞的微管	(75)
实验 25 人微量外周血淋巴细胞培养及其染色体标本的制备	(78)
实验 26 染色体分带技术	(81)
实验 27 传代细胞培养及其增殖动力学检测	(84)
实验 28 细胞融合	(88)
实验 29 细胞凋亡	(90)

## 第三部分 研究性实验

实验 30 水生动物黏液细胞的分布	(95)
实验 31 染色体技术在生物分类中的应用	(95)
实验 32 利用染色体畸变与微核试验进行安全毒理评价和环境检测	(96)
实验 33 生物活性物质对巨噬细胞吞噬及其酶活性的影响	(97)
实验 34 中药对肝脏的保护作用	(98)
实验 35 多糖对淋巴细胞转化的影响	(99)
实验 36 诱导肿瘤细胞发生凋亡的有效成分的筛选	(101)
实验 37 抑制肿瘤细胞增殖的有效成分的筛选	(102)
附录	(105)
实验报告例文一	(105)
实验报告例文二	(107)
实验报告例文三	(110)
参考文献	(115)

# 第一部分

## 基础性实验

### 第一章 细胞形态与结构的观察技术

细胞形态与结构的观察技术主要包括生物制片和观察两个方面的技术。

多数的生物组织是由多层细胞构成的,要想在显微镜下对其结构进行观察,首先必须将其分离成单个细胞或薄片,固定于一定的载体(如玻片)上,经染色等处理,使其结构更易观察,对生物材料的这一处理过程称为生物制片。生物制片的方法可分为切片法和非切片法两大类。

生物组织往往比较柔软,不易被切成薄片。切片法就是用某种介质包埋生物组织或利用物理的方法使组织获得一定的硬度,再用切片机将组织切成薄片,经染色等处理制成玻片标本。根据所用包埋介质的不同,可分为石蜡切片法、冰冻切片法和超薄切片法等,石蜡切片和冰冻切片用于光学显微镜观察,超薄切片用于电镜观察。切片法一般包括取材、固定、包埋、切片、染色、封存等主要步骤。取材是根据研究与实验的目的选取相应的生物组织,要尽可能取新鲜生物材料,最好是活体组织,以最大限度反映其真实的生活状态下的结构。生物组织中含有各种酶,取材后若不及时处理,材料就会腐败变质。固定就是把从生物体取下的新鲜组织及时放入固定剂中,通过化学试剂的作用使酶的活性灭活或降低,使组织细胞的形态结构得到保持。常用的固定剂包括甲醛、乙醇、醋酸、戊二醛、锇酸等能够使蛋白质变性的化学试剂。包埋是使组织材料硬化的过程,用于石蜡切片的包埋剂是石蜡,超薄切片的包埋剂常用的是环氧树脂。硬化了的材料就可以用切片机切成很薄的切片了。由于组织或细胞的许多结构在自然状态下是无色或浅色的,大部分组织须经染色后才能使结构显现出来。染色就是利用染色剂与细胞内含物的物理与化学作用,将细胞和组织的不同结构染成各种不同的颜色或不同的颜色深度,以便于观察。

非切片法是不经过切片,用物理或化学方法将生物组织分离成单个细胞或薄片,或将生物体整体封藏进行制片的一种方法。非切片法简单易行,快速方便。常用的非切片法有涂片法、压片法、滴片法和印片法等。涂片法就是将组织或细胞均匀地涂在载玻片上,经染色后观察,动物的血液、骨髓、精液以及植物花粉母细胞等可用涂片法制片。压片法是将一些柔软的材料(如果蝇或摇蚊幼虫的唾液腺、植物的根尖等)在载玻片上压碎的一种非切片法,观察有丝分裂过程或制备染色体标本,可采用此法制片。滴片法是将组织或细胞解离成细胞悬液,直接滴到载玻片

上。骨髓细胞、体外培养细胞、肝组织、脾脏、生殖腺、早期胚胎等,均可制成细胞悬液,用滴片法制片。制备动物染色体标本时也常采用滴片法。印片法是将新鲜组织的表面或切面向载玻片上印一下,细胞即被沾在载玻片上,经染色后即可观察。

根据保存时间的长短,生物制片又可以分为临时制片和永久制片。临时制片适合于临时性的观察,生物材料往往不需要进行固定、脱水与封固处理。永久制片可以长期保存,便于以后用其进行研究和教学,必须要对生物材料进行固定、脱水与封固处理。

细胞的体积较小,用肉眼无法看到,必须借助显微镜。光学显微镜的发明导致了细胞的发现,促进了细胞生物学的发展,至今仍然是细胞学研究的最基本和最常用仪器。在普通光学显微镜的基础上,进一步发展出了荧光显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜等多种有特殊功能的显微镜,使显微镜的功能得到了拓展。由于受照射光波长的限制,光学显微镜的分辨率较低,不能观察细胞内部的细微结构。电子显微镜是以波长很短的电子束为光源,分辨率得到了极大提高,它的诞生使人们发现了细胞的超微结构。随着扫描隧道显微镜、激光共聚焦显微镜等一系列新型显微镜的发展,使细胞的观察技术提高到了一个崭新水平。

## 实验 1 普通光学显微镜的结构及使用

### 【目的要求】

1. 了解普通光学显微镜的工作原理,掌握光学显微镜的使用方法。
2. 熟悉光镜下细胞的基本形态与结构。

### 【实验原理】

复式显微镜是由位于同一光轴的两个正透镜——物镜和目镜组成的最普通的一种显微镜。它主要由光学和机械两大系统构成。

#### 一、光学系统及其工作原理

显微镜的光学系统由物镜、目镜、聚光器、光源等部件组成,包括两条光路:成像光路和照明光路。

#### 1. 显微镜的放大原理

显微镜是根据透镜成像的原理,对微小物体进行放大的(图 1-1)。当被检物体  $AB$  放在物镜前方的  $1 \sim 2$  倍焦距之间,光线通过物镜在镜筒中形成一个倒立的放大实像  $A_1 B_1$ ,这个实像恰好位于目镜的焦平面之内,通过目镜后形成一个放大的倒立虚像  $A_2 B_2$ 。通过调焦装置使  $A_2 B_2$  落在人眼睛的明视距离(250 mm)处,使眼睛所看到的物体最清晰。即倒立虚像  $A_2 B_2$  是在眼球晶状体的两倍焦距之外,通过眼球后,在视网膜形成一个正立实像  $A_3 B_3$ ,被放大的倒立虚像  $A_2 B_2$  与视网膜上正立实像  $A_3 B_3$  是相吻合的。

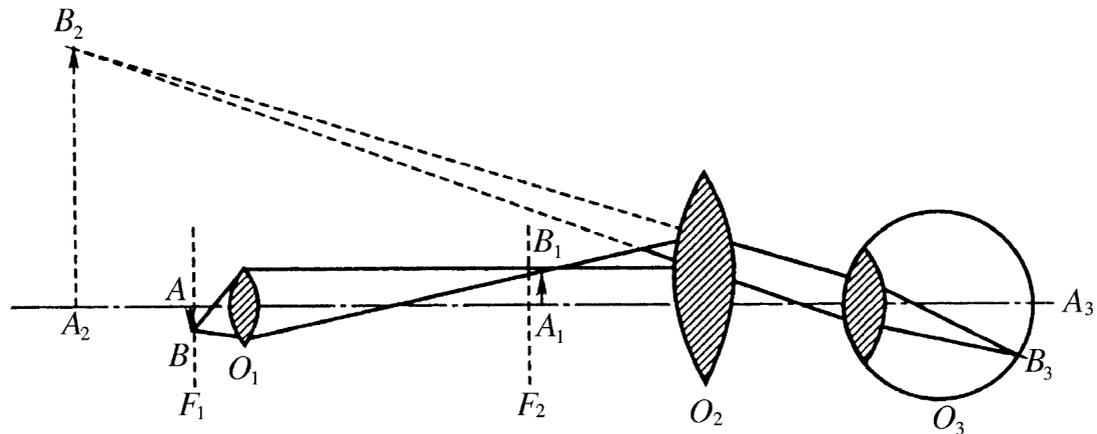


图 1-1 光学显微镜的放大原理和光路图(引自汪德耀)  
 $O_1$  物镜;  $O_2$  目镜;  $O_3$  眼球;  $F_1$  物镜的前焦点;  $F_2$  目镜的前焦点

## 2. 显微镜的照明原理

显微镜的照明光路根据设计不同,有两种类型的照明方式:一种简单的照明方式称为临界照明(critical illumination),即在光源和物体之间设有一个简单的聚光器,调节这个聚光器的位置可使光源灯丝的像聚焦并且叠加在标本平面上,所以标本照明不均匀;另一种为科勒照明(Köhler illumination)系统,在照明光路中除有聚光器外,还在放置光源的灯室内设有集光器(图 1-2)。经过科勒照明光路后,光源灯丝的像就不再叠加在标本平面上,而是在标本平面上呈现一个照明区,这个照明区实际上是视场光阑经聚光器后在标本平面上的成像。所以,通过调节聚光器的位置,可使照明区的边界聚焦清楚;通过调节视场光阑的大小,可改变照明区的大小;通过调节聚光器上的调中螺旋,可调节照明区的位置。

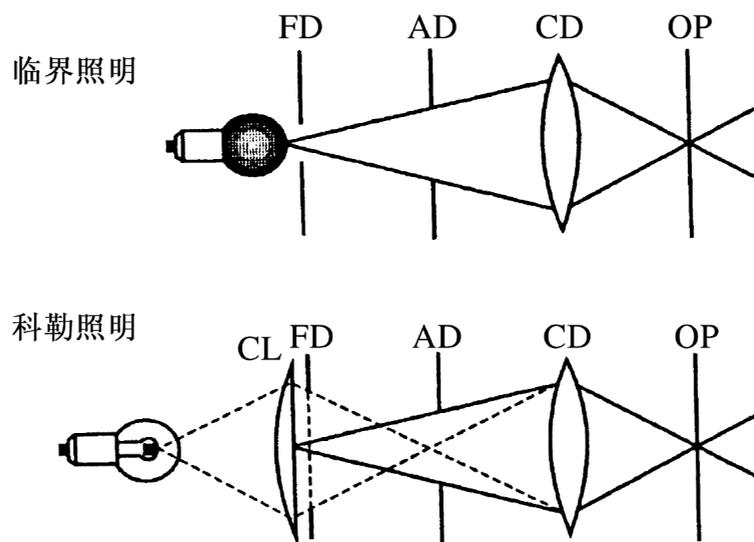


图 1-2 临界照明和科勒照明(引自林加涵等)  
 CL 集光器; FD 视场光阑; AD 孔径光阑; CD 聚光器; OP 载物台

科勒照明比临界照明优越之处表现在: 其一是照明均匀,因为在标本平面上成像是视场光阑而不是灯丝;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,通过缩

小视场光阑,就可以减少照明区域,使标本的其他部分不受热,并且减少了杂散光的干扰。所以这种照明方式已普遍用于显微镜,成为显微观察、显微摄影、相差显微镜等必不可少的一环。

## 二、光学显微镜的主要性能参数

显微镜的主要性能包括分辨率、放大率、清晰度、焦点深度、镜像亮度和视场亮度等。

### 1. 分辨率

分辨率(resolving power)也称分辨力,是指在 25 cm 的明视距离处能区分被检物体上两个相近质点间的最小距离。分辨率是评价各种显微镜识别微观物像的能力的重要指标。分辨率越小,说明显微镜的分辨能力越高。显微镜的分辨率和物镜的数值孔径(numerical aperture,  $N.A.$ , 也称镜口率)、照明光线的波长有直接关系,计算公式为:

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

上式中  $R$  为分辨率,  $\lambda$  为照明光线波长,  $N.A.$  为物镜的数值孔径,  $n$  为介质的折射率,  $\alpha$  为镜口角(也称孔径角、视锥顶角)。镜口角是指位于物镜光轴上的物点发出的光线延伸到物镜前透镜有效直径的两端所形成的夹角(图 1-3)。镜口角越大,进入物镜的光线越多,理论上  $\sin(\alpha/2)$  的最大值为 1。

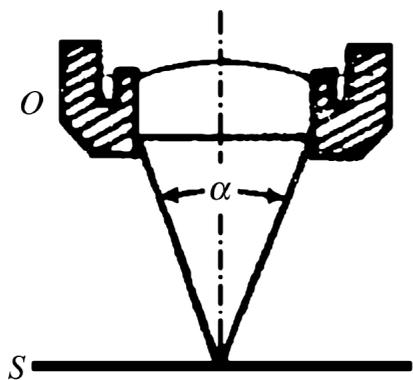


图 1-3 物镜的镜口角  
O 物镜; S 标本;  $\alpha$  镜口角

目前在实用范围内物镜的最大数值孔径为 1.4, 而可见光最短的波长为  $0.4 \mu\text{m}$ , 代入公式则:

$$R = 0.61 \times 0.4 / 1.4 = 0.17$$

由此可知,光学显微镜最大的分辨率约为  $0.2 \mu\text{m}$ , 差不多等于可见光最短波长的一半。

从上式可知,要增加分辨能力(即减小分辨率)有两个办法:一是增大数值孔径,二是缩短照明光波长。由于数值孔径受介质折射率和透镜镜口角的限制,它的数值是有一定限度的,只有缩短光源的波长,才是最有效的办法。

### 2. 放大率与有效放大倍数

放大率也称放大倍数。显微镜的总放大倍数等于目镜和物镜放大倍数的乘积。公式如下:

$$M = M_{ob} \times M_{oc} = \frac{250}{f_1} \times \frac{250}{f_2}$$

式中:  $M$ ——总放大倍数

$M_{ob}$ ——物镜放大倍数

$M_{oc}$ ——目镜放大倍数  
 $f_1$ ——物镜焦距(单位: mm)  
 $f_2$ ——目镜焦距(单位: mm)

——光学筒长(单位: mm)

250——明视距离(单位: mm)

由公式可知,物镜的放大率是对一定镜筒长度而言的,镜筒长度的变化,不仅导致放大率变化,而且成像质量也受到影响。因此,显微镜的镜筒长度是一定的。标准机械筒长是从镜筒的目镜管上缘至物镜螺旋肩的距离,以 mm 表示。显微镜生产厂家将标准机械筒长标刻在物镜的外壳上,现在主要有两种标准,即 160 mm 和 170 mm。标准光学筒长是指目镜的前焦点与物镜的后焦点之间的距离。一般光学筒长略大于机械筒长。

适宜的总放大率是所用物镜数值孔径的 500 ~ 1 000 倍,在此范围内称为有效放大倍数。如果高于上述范围,为空放大,即无法分辨细微结构;如果低于上述范围,则因放大率过低,难以观察。

### 3. 清晰度

清晰度是指显微镜形成轮廓明显物像的能力。影响物像清晰度的主要因素是物镜。由于照明光的光谱成分不同会造成色差以及透镜本身所造成的球面像差,所以像差总是难免的。同一光学系统中,放大倍数越高,像差就越大。要提高物像的清晰度,必须使用高数值孔径的物镜,并匹配低倍的目镜,而不应单纯增加目镜的放大倍数。

加大光学筒长虽然可提高总放大倍数,但影响物镜的成像清晰度。显微镜的机械筒长是一定的,但盖玻片过厚或过薄都会导致光学筒长的变化。使用数值孔径较低的物镜时,成像质量很少受盖玻片厚度的影响;但使用数值孔径较高的物镜时,如果盖玻片过薄(厚度小于 0.15 mm),则影响物镜的成像质量。因为物镜对盖玻片的厚度是有一定要求的,而且是按照标准盖玻片的厚度设计的。国际上统一规定标准盖玻片的厚度为 0.17 mm,通常这一数字也标刻在物镜的外壳上。

### 4. 焦点深度

当显微镜对标本的某一点或平面聚焦时,焦点平面上下物像清晰的距离或深度就是焦点深度。其计算公式为:

$$T = \frac{K \cdot n}{M \cdot NA}$$

式中:  $T$ ——焦点深度

$K$ ——常数,约等于 0.24

$M$ ——显微镜的总放大倍数

$n$ ——被检物体周围介质的折射率

$NA$ ——物镜的数值孔径

从上式可知,焦点深度与总放大率和镜口率成反比,因此,高放大率和高镜口率的显微镜其焦深就浅,不能看到标本的全厚度。必须调节螺旋仔细地从上到下进行观察。另外,被检物体周围介质(封片剂)的折射率加大可增大焦深。尤其在显微摄影时,更应考虑封片剂的使用。

## 5. 镜像亮度和视场亮度

镜像亮度是显微镜的图像亮度的简称,指在显微镜下所观察到的图像的明暗程度。镜像亮度与镜口率的平方成正比,与总放大倍数成反比。使用显微镜时,对镜像亮度的要求一般是使眼睛既不感到暗淡又不耀眼。

视场亮度是指显微镜下整个视场的明暗程度。视场亮度不仅与目镜、物镜有关,还直接受聚光器、光阑和光源等因素的影响。在不更换物镜和目镜的情况下,视场亮度越大,镜像亮度也就越大。

### 【实验用品】

人血涂片、蚕豆根尖切片、洋葱根尖切片、兔肝切片、鼠肝切片、蛙卵切片、马蛔虫受精卵装片、肌肉切片等。

### 【方法与步骤】

#### 一、光学显微镜的构造

光学显微镜主要由机械系统和光学系统构成。

#### 1. 机械系统

##### (1) 镜筒

镜筒是安装在光镜最上方或镜臂前方的圆筒状结构,其上端装有目镜,下端与

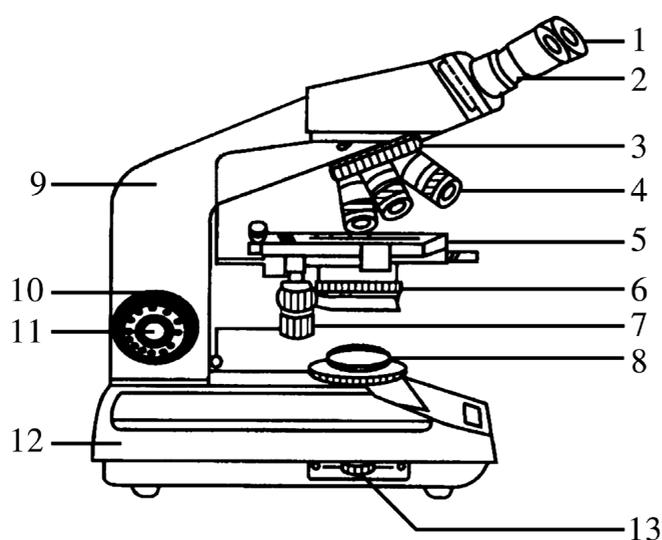


图 1-4 光学显微镜主要结构示意图

1. 目镜; 2. 镜筒; 3. 物镜转换器; 4. 物镜;  
5. 载物台; 6. 聚光器; 7. 标本移动器螺旋;  
8. 照明装置; 9. 镜臂; 10. 粗调螺旋;  
11. 微调螺旋; 12. 镜座; 13. 电压调节钮

物镜转换器相连(图 1-4)。根据镜筒的数目,光镜可分为单筒式、双筒式、三筒式、四筒式等多种。单筒光镜又分为直立式和倾斜式两种,直立式的目镜与物镜的中心线(光轴)在同一直线上;而倾斜式目镜与物镜的中心线成  $45^\circ$ ,在其镜筒中装有能使光线折射  $45^\circ$  的棱镜。双筒光镜的镜筒均为倾斜式的;三筒式的 2 个目镜用于观察,另一个用于显微摄影;四筒式的由两个双筒目镜构成,可供两人同时观察。

##### (2) 物镜转换器

物镜转换器又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘状结构,可以按顺时

针或逆时针方向旋转,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物镜达到工作位置(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

镜臂是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时握持的部位。镜筒直

立式光镜在镜臂下方有一倾斜关节,可调节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  $45^\circ$ ,否则,由于重心偏移,显微镜容易翻倒。

#### (4) 调焦螺旋

调焦螺旋是调节焦距的装置,位于镜臂的上端(直立式镜筒)或下端(倾斜式镜筒),分为粗调螺旋(大螺旋)和微调螺旋(小螺旋)。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。微调螺旋只能使镜筒或载物台缓慢或较小幅度地升降,升或降的幅度不易被肉眼观察到,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,粗调螺旋和微调螺旋重合在一起,安装在镜臂的两侧。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,向内转偏紧)。另外,在左侧粗调螺旋的内侧有一粗调限位凸柄,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,但微调螺旋仍可调节。

#### (5) 载物台

载物台也称镜台,是位于物镜转换器下方的方形平台,用于放置被观察的玻璃标本。载物台的中央有圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔折射到标本上。

在载物台上装有标本移动器,也称推片器,其上安装的弹簧夹用于固定玻片标本,旋动推片器上的两个螺旋可使玻片标本前后左右移动,便于寻找观察目标。

在推片器上附有纵、横游标尺,用以确定标本的位置。游标尺由主标尺和副标尺组成,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,依据重合点即可读出准确的数值。

#### (6) 镜座

镜座位于最底部,是整台显微镜的基座,用于支持和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有照明光源。

### 2. 光学系统

#### (1) 物镜

物镜安装在物镜转换器上。每台光镜一般有 3~4 个不同放大倍数的物镜,每个物镜由数片凸透镜组成,是决定显微镜光学性能的主要部件。根据放大倍数可分为低倍镜、高倍镜和油镜等三种,常用的低倍镜有“ $4\times$ ”和“ $10\times$ ”,高倍镜有“ $40\times$ ”或“ $45\times$ ”,油镜为“ $100\times$ ”。

物镜的金属外壳上标刻有多种数字和符号,分别代表物镜的光学性能、规格、类别和使用条件等(表 1-1)。其中最主要的参数有放大倍数、数值孔径、机械筒长和盖玻片厚度等(图 1-5)。

表 1-1 显微镜的物镜常见符号一览表

缩写符号	英文名称	中文名称
Ach	achromatic objective	消色差物镜
APO	apochromatic objective	复消色差物镜
FL	fluorite objective	萤石物镜、半复消色差物镜
oil、oel、Hi	oil immersion	油浸物镜
oil + w	oil & water immersion	油、水浸两用物镜
Ph、Phaco	phase contrast	相差物镜
PL、PLAN	plan objective	平场消色差物镜、平场物镜
PL · APO	plan apochromatic objective	平场复消色差物镜
PL · FL	plan fluorite objective	平场萤石物镜
UVFL	ultraviolet fluorescence	荧光物镜
W、Water	water immersion	水浸物镜

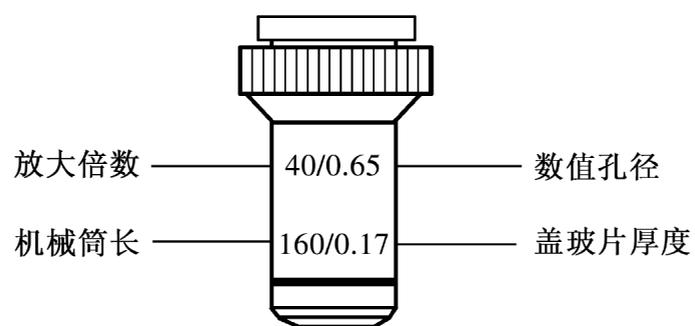


图 1-5 物镜的性能参数

## (2) 目镜

目镜也称接目镜,安装在镜筒的上端,其作用是将物镜所放大的中间像进一步放大,还可以校正中间像中的残余像差。每个目镜由两个透镜(即接目透镜和会聚透镜)组成,在上、下两个透镜之间设有能决定视野大小的金属制光阑,此光阑的位置就是物镜所放大实像的位置。可在光阑上安装目镜测微尺或指针,以便于观察。一般目镜的放大倍数有  $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$  三种,可与物镜搭配使用。

## (3) 聚光器

聚光器位于载物台通光孔的下方,由聚光镜和孔径光阑构成,其主要功能是将光线会聚放大,射向被检样品,进入物镜。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。在聚光器的下方,有一调节螺旋,可调节聚光器的升降,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。同时,调节聚光器的高度,也可以适度改变成像的景深。

孔径光阑也称光圈或彩虹光阑,位于聚光器的下端,其孔径可变,能控制进入

聚光镜的光束大小,调节进光量。孔径光阑的开度对显微镜的成像质量有很大影响。

#### (4) 光源

光源可以是自然光源,也可以是电光源。利用自然光源,只需要反光镜即可。电光源常见的多为溴钨灯,灯泡的体积很小,钨丝似点状,灯壳为石英玻璃。一般为 12 V,功率 50 ~ 100 W,色光为连续光谱,色温一般在 3 200 ~ 3 400 K 之间。装卸灯泡时,不要用手直接触摸灯壳,以免污染,可垫一块薄纸或塑料包装袋。有污染物时,可用乙醇擦去,以免点亮时污染处焦化。

### 二、显微镜的使用

#### 1. 聚光器的调节

使用显微镜时,首先要进行光路合轴调整,将照明光束与显微镜的光轴调整到同一轴线上,使光源均匀地照明视场。

转动聚光器的升降旋钮,把聚光器升至最高位置。再打开电源灯开关,将标本放置在载物台上,用低倍镜聚焦。缩小视场光阑,在视场中可见边缘模糊的视场光阑图像,此时稍微降低聚光器,到视场光阑的图像清晰聚焦为止。旋转聚光器上的两个调中螺杆,将视场光阑图像调至视场中心;打开视场光阑,使图像周边与视场边缘相接。反复缩放视场光阑,确认光阑与视场完全重合即可。

#### 2. 光阑的调节

显微镜有两种光阑,即孔径光阑和视场光阑,两者都是可变光阑。孔径光阑通过光阑的缩放,限定聚光器的孔径大小;视场光阑控制照明束,限定视场大小。正确调节光阑,能够提高物像质量。

##### (1) 孔径光阑的调节

视场内的物像,其最大特点是反差小、焦点深度浅,但可以随着孔径光阑的缩小而提高。孔径光阑小于物镜的数值孔径时,显微镜的分辨能力和亮度降低,但物像反差和焦点深度提高,使物像更加清晰。所以,在不过多地降低分辨能力的前提下,把孔径光阑缩小到所用物镜数值孔径的 70% ~ 80% 较为适宜。例如,物镜的数值孔径为 1.0,孔径光阑的数值可调到 0.7 ~ 0.8。

调节孔径光阑时,如果聚光器标有孔径光阑数值,转动调节环对准所需的数值即可;如果没有孔径光阑数值,可在将标本聚焦后,从镜筒中取下目镜,在物镜的后焦面可见孔径光阑的影像。

光阑缩至最小,见一亮点,逐渐开大光阑,亮孔扩大,直至需要的程度。当光阑缩小,视场亮度降低时,可适当提高电压增加照明强度。

##### (2) 视场光阑的调节

视场光阑位于镜座中,用以控制照明光束的直径。缩小视场光阑,光束直径小于孔径光阑,视场亮度不足,物像不清晰;开大视场光阑,光束直径超出孔径光阑,

因光线过多,造成光线的乱反射,也影响物像的清晰度。因此,视场光阑的适宜大小,应以光阑的内缘线外切孔径光阑或孔径光阑外边内接视场光阑为度。

孔径光阑的调节取决于所用物镜的数值孔径。当两者相等时,分辨能力最高,孔径光阑适度小于物镜的数值孔径,物像反差和焦点深度增加。视场光阑随孔径光阑而变,总是外切孔径光阑。更换物镜时,数值孔径改变,孔径光阑重新调整,视场光阑也随之改变。

### 3. 工作距离

显微镜聚焦后,物镜前透镜至被检样品盖玻片上表面之间的距离为工作距离(working distance, W D.)。

工作距离随物镜种类不同而异,通常小于物镜焦距,物镜的放大倍数愈高,数值孔径愈大,焦距愈短,工作距离就愈小。当低倍镜被调节到工作距离后,可直接转换高倍镜或油镜,只需旋动微调旋钮,便可看到清晰的物像,这种情况称为同高调焦。大多数显微镜都具有同高调焦的功能。

### 4. 油镜的使用

使用油镜时,需要用香柏油或石蜡油作为介质。这是因为玻璃与空气的折射率不同(表 1-2),光线通过载玻片和空气进入物镜,部分光线产生折射而损失掉,导致进入物镜的光线减少,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,可减少光线的折射,增加视野亮度,提高分辨能力。

表 1-2 几种介质的折射率

介质名称	玻 璃	香 柏 油	石 蜡 油	水	空 气
折 射 率	1.52	1.51	1.46	1.33	1.00

不同的放大倍数、不同反差的标本需要不同的光亮度,而光亮度的调节需要将光源强度、聚光器和光阑综合协调,才会得到合适的效果,这是显微镜操作中非常重要的技术,需要长期实践,反复摸索,才能达到熟练的程度。

## 三、观察标本

1. 细胞的形态: 观察蚕豆根尖切片、兔肝切片,熟悉细胞的一般形态结构。
2. 细胞核和核仁: 观察蛙卵切片、肌肉切片、鼠肝切片,注意细胞的多核及多核仁现象。
3. 中心体: 观察马蛔虫受精卵装片,注意中心体的分布及形态特点。
4. 线粒体: 观察洋葱根尖切片、兔肝切片、鼠肝切片,找出线粒体的数量、分布及形态特征。
5. 叶绿体: 取菠菜的叶肉细胞制成临时装片,注意类囊体的形态和数目。

6. 高尔基复合体: 猫的神细胞装片, 注意高尔基体的形态特点及分布。

#### 【实验报告】

1. 简述显微镜的主要结构和操作要领。
2. 分析在使用低倍镜、高倍镜和油镜时, 对光亮度的要求。
3. 分析聚光镜在成像质量中的作用。
4. 绘图比较所观察到的不同的细胞形态与结构, 对其形态结构与功能的关系进行分析。

## 实验 2 血涂片的制备和细胞大小的测量

#### 【目的要求】

1. 掌握血涂片的制备方法。
2. 认识红细胞及各种白细胞的典型形态。
3. 掌握显微测微尺的使用方法。

#### 【实验原理】

血涂片是临床化验中最常规的技术, 也是血液学研究中的最基本技术。将血液样品制成单层细胞的涂片标本, 经瑞氏(Wright)染液染色后, 不同白细胞中的颗粒可以呈现不同的颜色。碱性粒细胞的颗粒呈蓝紫色, 酸性粒细胞的颗粒呈橘红色, 中性粒细胞的颗粒呈粉红色。根据细胞中颗粒的颜色、大小及多少, 再结合细胞的大小及细胞核的形态, 就可以将白细胞进行分类计数。

#### 【实验用品】

1. 器材: 医用一次性采血针、酒精棉球、镊子、经脱脂洗净的载玻片、目镜测微尺和镜台测微尺。

2. 试剂: 瑞氏(Wright)染液

瑞氏粉                      0.1 g

甲醇                         60 ml

瑞氏粉 0.1 g 置洁净研钵中, 加入 10~20 ml 甲醇, 充分研磨, 将已溶部分移入试剂瓶中, 未溶部分加适量甲醇研磨, 直至全部溶解。24 h 后即可使用。

#### 【方法与步骤】

##### 一、血涂片的制备与血细胞的观察

##### 1. 采血

采血前用 70% 酒精棉球消毒人的指腹或耳垂, 干后用采血针刺破指腹或耳垂的皮肤; 动物采血时先将耳部剪毛, 酒精消毒后, 刺破动物耳部皮肤, 挤去第一滴血不要(因含单核白细胞较多)。

##### 2. 涂片

挤出第二滴血置于载玻片的一端,再取另一张边缘光滑的载玻片,斜置于血滴的前缘,先向后稍移动轻轻触及血滴,使血液沿玻片端展开成线状,两玻片的角度

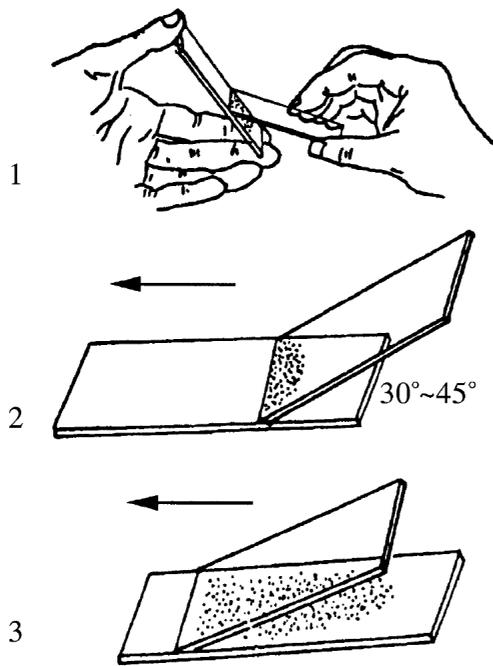


图 1-6 血涂片的制备方法

以  $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$  为宜(角度过大血膜较厚,角度小则血膜薄),轻轻将载玻片向前推进,即涂成血液薄膜(图 1-6)。推进时速度要一致,否则血膜成波浪形,厚薄不匀。

### 3. 染色

待涂片在空气中完全干燥后,滴加数滴瑞氏染液盖满血膜为止,染色  $1 \sim 3 \text{ min}$ 。然后滴加等量的缓冲液(pH6.4)或蒸馏水,使其与染液均匀混合,静置  $2 \sim 5 \text{ min}$ 。用蒸馏水冲去染液,吸水纸吸干,镜检。

### 4. 封片

经染色的涂片完全干燥后,用中性树脂胶封片保存。

5. 观察: 分别用低倍镜、高倍镜和油镜观察血涂片,分辨不同的血细胞类型。

## 二、显微测微尺的使用

显微测微尺是用来测量在显微镜下所观察到的物体的长度、面积的工具,包括镜台测微尺、目镜测微尺两部分。镜台测微尺是一块中央固定了一圆形测微尺的特殊载玻片,该测微尺长  $1$  或  $2 \text{ mm}$ ,分成  $100$  或  $200$  格,每个的实际长度为  $0.01 \text{ mm}$  ( $10 \mu\text{m}$ ),是专门用来标定目镜测微尺上每一刻度所代表的微米数的。

目镜测微尺是放在目镜中的一种标尺,分为固定式和移动式两种。固定式目镜测微尺是一块圆形玻片,中心刻有标尺,有直线式的,有网式的,标尺一般长  $5 \sim 10 \text{ mm}$ ,分成  $50 \sim 100$  格。每格的实际长度因不同物镜的放大率和不同镜筒的长度而改变。移动式目镜测微尺的标尺基本上和直线式目镜测微尺相同,所不同的是除了这种固定的标尺外,还有可移动位置的指示线。它装在一个特制的目镜中,右边由一个能旋转的小轮控制着,轮上有刻度,分成  $100$  格,此轮每旋转一圈目镜内能移动的指示线[标准线]就移动一格。由于物镜的放大倍数不同,所以不同物镜下目镜测微尺的刻度所代表的长度也不一样,当用目镜测微尺测量细胞的大小,必须先用镜台测微尺标定目镜测微尺每一格所代表的微米数。方法如下:在显微镜载物台上放置镜台测微尺,转动显微镜镜筒并移动镜台测微尺,调整目镜测微尺的纵线与镜台测微尺刻度线平行并重合的位置,将目镜测微尺的一条细线重合在一起(使两尺左边的一条直线重合),然后由左向右找出两尺另一重合线间两尺的刻度数,按下式计算目镜测微尺每格等于多少微米。

$$X = \frac{na}{M}$$

式中： $X$ ——目镜测微尺每格的实际刻度值。

$a$ ——镜台测微尺每格的刻度值(通常为  $10\ \mu\text{m}$ )。

$n$ ——镜台测微尺的刻度数。

$M$ ——目镜测微尺的刻度数。

细胞大小的测量：测量各种血细胞长、短半径，根据测量的结果及下列公式计算各种细胞及细胞核的体积，比较细胞的大小。

$$\text{椭球形：} V = \frac{4}{3} ab^2 \quad a\text{——长半径，} b\text{——短半径}$$

$$\text{圆球形：} V = \frac{4}{3} r^3 \quad r\text{——半径}$$

$$\text{圆柱形：} V = r^2 h \quad r\text{——半径，} h\text{——高}$$

#### 【实验报告】

1. 绘制不同类型的血细胞图，分析比较各种血细胞的大小和形态特征。
2. 对测量的各种细胞的大小进行统计，计算其细胞体积。

## 实验 3 石蜡切片的制作及 HE 染色

#### 【目的要求】

1. 熟悉石蜡切片的制作过程。
2. 掌握 HE 染色的基本原理和染色方法。

#### 【实验原理】

石蜡切片是最基本的切片技术，冰冻切片和超薄切片等都是在石蜡切片基础上发展起来的。苏木素(Hematoxylin)与伊红(Eosin)对比染色法(简称 H.E. 对染法)是组织切片最常用的染色方法。这种方法适用范围广泛，对组织细胞的各种成分都可着色，便于全面观察组织构造，而且适用于各种固定液固定的材料，染色后不易褪色可长期保存。经过 HE 染色，细胞核被苏木素染成蓝紫色，细胞质被伊红染色呈粉红色。

#### 【实验用品】

1. 器材：恒温箱、切片机、解剖器械、载玻片、酒精灯、染色缸和烧杯等。
2. 试剂
  - (1) Carnoy 固定液：无水乙醇 60 ml、氯仿 30 ml、冰醋酸 10 ml。
  - (2) 各级浓度的乙醇溶液。
  - (3) Ehrlich 苏木精染液：苏木精 2 g、95% 乙醇溶液 100 ml。溶解后加入：钾

矾 3 g、纯甘油 100 ml、冰醋酸 10 ml、蒸馏水 200 ml。

(4) 伊红染液：伊红 1 g 溶于 100 ml 90% 乙醇溶液。

3. 材料：小鼠小肠或肝组织。

#### 【方法与步骤】

1. 取材：颈椎脱臼法处死小鼠，打开腹腔，剪取肝组织（或小肠）。切取的组织块不宜太大，以便固定剂穿透，通常以 5 mm × 5 mm × 2 mm 或 10 mm × 10 mm × 2 mm 为宜。

2. 固定：用生理盐水将组织洗一下，立即投入 Carnoy 固定液固定 30 ~ 50 min。

3. 冲洗：50% 乙醇 30 min。

材料经固定后，除乙醇外，组织中的固定液必须冲洗干净，尤其是含有重金属的固定液。因为残留在组织中的固定液，有的不利于染色，有的产生沉淀或结晶影响观察。冲洗方法根据固定液的性质而定，固定液为水溶液的常用水洗涤，固定液含有乙醇的则用 50% 或 70% 乙醇冲洗。

4. 脱水：放入 50%、70%、80%、90% 各级乙醇溶液脱水各 40 min，放入 95%、100% 乙醇溶液各两次，每次 20 min。

各种材料经固定与洗涤后，组织中含有大量水分，由于水与石蜡不能互溶，所以必须将组织中的水分除去。

5. 透明：放入二甲苯与 100% 乙醇溶液各半的混合液 20 min，再放入二甲苯透明 20 min。

由于乙醇与石蜡不相溶，而二甲苯既能溶于乙醇又能溶于石蜡，所以脱水后还要经过二甲苯予以过渡。当组织中全部被二甲苯占有时，光线可以透过，组织呈现出不同程度的透明状态。

4. 透蜡：放入二甲苯石蜡各半的混合液 15 min，再放入石蜡、石蜡透蜡各 20 ~ 30 min。

透蜡的目的是除去组织中的透明剂（如二甲苯等），使石蜡渗透到组织内部达到饱和程度以便包埋。透蜡时间根据组织材料的种类、大小而定，一般来说，动物组织透蜡时间较短，约 1 至数小时；植物组织的透蜡时间较长，约需 1 ~ 2 d。透蜡应在恒温箱内进行，并保持箱内温度在 55 ~ 60 左右，注意温度不要过高，以免组织发脆。

5. 包埋：将经过透蜡的组织连同熔化的石蜡，一起倒入容器内，然后立即投入冷水中，使其立刻凝固成蜡块。

用于包埋的石蜡的熔点在 50 ~ 60 之间，包埋时应根据组织材料、切片厚度、气候条件等因素，选择不同熔点的石蜡。一般动物材料常用的石蜡熔点为 52 ~ 56，植物材料用的石蜡熔点为 54 ~ 58。

## 6. 切片 (图 1-7)

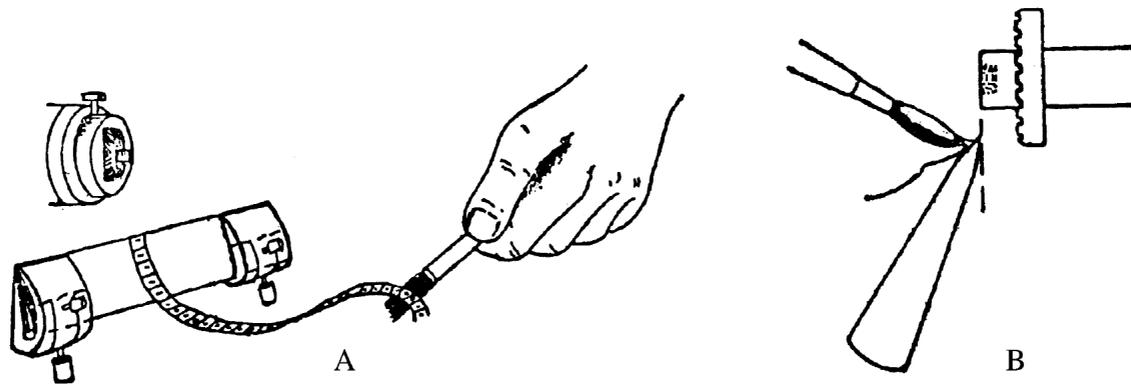


图 1-7 切片操作(引自芮菊生等)

A. 用毛笔托住蜡带; B. 用毛笔抵住蜡带, 以防切片上卷

(1) 蜡块的固着与修整: 固着蜡块时, 先用刀片将石蜡块修切成正方形或长方形, 取小木块(或金属小盘)用蜡铲加上热石蜡, 再把蜡块底面烙熔, 迅速粘到小木块上, 冷却后装在切片机上。要使组织切面与刀面平行, 并使切面稍微离开刀面。蜡块在切片前必须先进行修整, 将组织块以外的多余石蜡切去, 但注意不要太靠近组织, 让组织四周留有 1~2 mm 的石蜡。

(2) 安装切片刀: 将切片刀装至切片机上, 使刀刃下面与垂直面所成的夹角以  $4^{\circ}\sim 6^{\circ}$  为宜。

(3) 切片操作: 固定好切片刀后, 调整到所需的切片厚度, 松开转轮固定器, 缓慢转动转轮。随着切片机的转动, 材料按规定的厚度向前推移, 形成一条连续的蜡带。

(4) 用毛笔托住蜡带, 挑断后依次平放在蜡带盒内。放蜡带时, 靠刀面的光滑面朝下放; 有皱纹的一面朝上放。

7. 贴片与烤片: 取洗净的干玻片, 滴加适量蒸馏水, 挑取蜡片使其漂浮于水滴表面, 在酒精灯火焰上方适度加热至蜡片舒展。用解剖针摆好切片位置, 将玻片斜放, 控掉水分, 放置过夜至数天, 或放置于  $37^{\circ}\text{C}$  烤箱中过夜, 使切片贴牢。

8. 脱蜡复水: 石蜡切片经二甲苯、脱蜡各 5~10 min, 然后放入 100%、95%、90%、80%、70% 等各级乙醇溶液中各 3~5 min, 再放入蒸馏水中 3 min。

染色液多数为水溶液, 因此, 染色前必须将蜡脱去, 使切片中的材料由有机相进入水相。一般采用二甲苯脱蜡, 逐级浓度乙醇复水, 即由高浓度乙醇逐渐过渡到低浓度乙醇, 最后至水。脱蜡复水与脱水浸蜡过程正好相反, 但是, 由于蜡片较薄, 所需时间比脱水浸蜡要短的多。

9. 染色: 切片放入苏木色精中染色约 10~30 min。染色时间应根据染色剂的成熟程度及室温高低, 适当缩短或延长。室温高时促进染色, 染色时间可短些, 否则可适当延长时间, 冬季室温低时可放入恒温箱中染色。

10. 水洗: 用自来水流水冲洗约 15 min。冲洗过程中使切片颜色发蓝(或放入碱性水中也可, 但用促蓝剂对伊红可能拒染, 如果时间来得及, 应以流水冲洗使切片显示蓝色为宜), 但要注意流水不能过大, 以防切片脱落, 并随时用显微镜检查见颜色变蓝为止。

11. 分化: 就是将细胞质着的色褪去, 使细胞核着色更加鲜明, 也称分色。将切片放入 1% 盐酸乙醇液(盐酸 1 份 + 70% 乙醇 100 份)中褪色, 见切片变红, 颜色较浅时即可, 约数秒至数十秒钟。这一步骤是 H.E. 染色成败的关键, 如分化不当会导致染色不匀、或深或浅, 得到的切片染色效果差。如果染色适中, 可取消此步骤。

12. 漂洗: 切片再放入自来水流水中使其恢复蓝色。低倍镜检查见细胞核呈蓝色、结构清楚; 细胞质或结缔组织纤维成分无色为标准。然后放入蒸馏水中漂洗一次。

13. 脱水 : 切片入 50% 乙醇 70% 乙醇 80% 乙醇中各 3 ~ 5 min。

14. 复染: 用 0.5% 伊红乙醇液(伊红 0.5 g + 95% 乙醇 100 ml)对比染色 2 ~ 5 min。伊红主要染细胞质, 着色浓淡应与苏木素精染细胞核的浓淡相配合, 如果细胞核染色较浓, 细胞质也应浓染, 以获得鲜明的对比。反之, 如果细胞核染色较浅, 细胞质也应淡染。可在伊红乙醇液中滴加数滴冰醋酸助染, 促使细胞质容易着色, 并且经乙醇脱水时不易褪色。

15. 脱水 : 放入 95% 乙醇中洗去多余的红色, 然后放入无水乙醇中 3 ~ 5 min。最后用吸水纸吸干多余的乙醇。

16. 透明: 切片放入二甲苯-乙醇等量混合液中约 5 min, 然后放入纯二甲苯、中各 3 ~ 5 min。二甲苯应尽量保持无水, 应经常更换, 或用纱布包无水硫酸铜放入染色缸内吸收水分。切片如在二甲苯中出现白雾现象, 说明脱水未尽, 应退回乙醇中重新脱水, 否则切片难以镜检。

17. 封藏: 中性树脂封存。

切片经染色、脱水、透明后, 即可用封藏剂将其封藏起来, 目的是永久保存切片, 便于镜检。常用的封藏剂一类为干性封藏剂如中性树脂、加拿大树胶等, 另一类为湿性封藏剂如甘油明胶等。如果切片是经二甲苯透明, 则用树脂作为封藏剂, 树脂可以用二甲苯稀释至合适的稠度。如果切片是直接从水中或水溶液中取出, 则常用甘油明胶作为封藏剂, 可用于短期保存标本。

染色结果: 细胞核被苏木素染成蓝色, 细胞质被伊红染色呈粉红色。

#### 【实验报告】

1. 简述石蜡切片的主要过程。
2. 分析影响 HE 染色的主要因素。

## 实验 4 特殊显微镜的使用

### 4.1 荧光显微镜

#### 【目的要求】

1. 了解荧光显微镜的基本构成和基本原理。
2. 初步掌握荧光显微镜的调节步骤和使用。

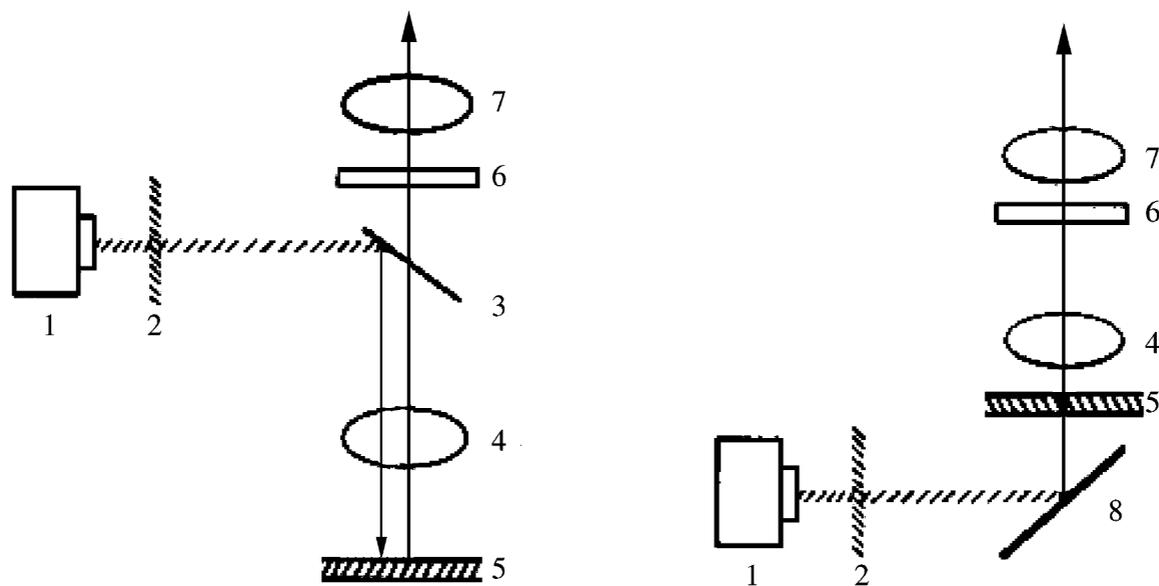
#### 【实验原理】

荧光显微镜是利用一个高发光效率的点光源,经过滤色系统,发出一定波长的光(紫蓝光或紫外光)作为激发光,能激发标本的荧光物质使其发出一定的荧光,再通过物镜和目镜放大后进行观察。

荧光显微镜的光路,根据荧光激发方式的不同,可分为落射式和透射式两种。落射式比透射式具有较多的优越性,因而,生物学和医学观察中大多使用落射式荧光显微镜。

#### 1. 落射式荧光显微镜的光路

从汞灯或氙灯发射出的高强激发光,经激发滤光片到达双色反射镜,在此处分光后,较短波长的激发光反射向下进入物镜,通过物镜射向样品,样品产生的荧光反射向上再进入物镜,又经双色反射镜的分光作用,较长波长的荧光透射向上经阻断滤光片进入目镜(图 1-8)。



落射式(仿李素文)

透射式

图 1-8 荧光显微镜的光路

1. 光源; 2. 激发滤光片; 3. 二向色镜; 4. 物镜;  
5. 样品; 6. 阻断滤光片; 7. 目镜; 8. 反射镜

## 2. 透射式荧光显微镜的光路

从汞灯或氙灯发射出的高强激发光,经激发滤光片到达光路转换反射镜后光线转射向上,经视场光阑和聚光器进入样品,激发出的荧光射入物镜,再经阻断滤光片进入目镜(图 1-8)。

荧光显微镜和普通光学显微镜基本相同,主要区别是荧光显微镜具有荧光光源和滤色系统。

### (1) 荧光光源

一般用高压汞灯或氙灯,汞灯在 366 nm、405 nm、436 nm、546 nm、577 nm 处有很强的发射线,氙灯也在光的紫外区、可见区有较强的发射线。

### (2) 滤色系统

由激发滤光片、阻断滤光片和双色反射镜组成。

1) 激发滤光片 放置于光源和物镜之间,可提供一定波长的激发光。常用的激发滤光片能产生 420 nm 的蓝紫光或 365 nm 的紫外光。

2) 阻断滤光片 必须与激发滤光片配合使用。因为激发光通过样品后与新生的荧光成为混合光束进入物镜,阻断滤光片可阻断掉一些较短波长的激发光,而只让所需要的纯荧光到达目镜供观察,同时也保护了眼睛不受激发光的影响。

3) 双色反射镜 落射式荧光显微镜的光路中装有双色反射镜,其方位与激发光的平行光轴以及目镜-物镜构成的垂直光轴均呈 45°,其作用是透射较长波长的发射荧光和反射较短波长的激发光,因此,可对激发光和荧光进行初步分流。

为了获得好的观察效果,应根据荧光物质的吸收光谱和发射光谱选择适宜的激发滤光片、阻断滤光片和双色反射镜。已有生产厂家将激发滤光片、阻断滤光片和双色反射镜匹配为若干组合,以方便使用。

## 3. 物镜

由于激发光和收集荧光都是由同一物镜实现的,所以荧光物镜采用的是能透过紫外线的特制物镜。荧光效率与所用物镜数值孔径的 4 次方成正比,所以用数值孔径较大的浸液物镜(水浸或油浸)效果较好。

### 【实验用品】

1. 器材: 荧光显微镜、细胞培养用品、载玻片、盖玻片、擦镜纸等。
2. 试剂: 吖啶橙荧光染料, 细胞培养液等。
3. 材料: 培养细胞, 口腔黏膜上皮细胞涂片。

### 【方法与步骤】

1. 打开光源, 高压汞灯或氙灯要预热几分钟才能达到最亮。
2. 根据观察的标本所染的荧光染料, 选择不同的激发滤光片阻断滤光片组合。

3. 用低倍镜观察,调整光源使其亮区位于视野中央。
4. 放置标本(吖啶橙染人口腔黏膜上皮细胞),调焦后即可观察。

#### 【注意事项】

1. 切断电源后,必须等汞灯冷却后才能再次启动,并尽量减少启动次数。
2. 标本照射时间过长(数分钟后),会发生荧光减弱的现象。所以显微摄影时,应采用快速底片、低倍放大目镜和大镜口率物镜,以缩短曝光时间。
3. 用油镜观察标本时,必须用本身不含荧光物质的特殊镜油。
4. 未装滤光片不要用肉眼直接观察,以免损伤眼睛。
5. 荧光显微镜标本要求切片较薄(冰冻切片  $15 \sim 20 \mu\text{m}$ ,石蜡切片  $< 10 \mu\text{m}$ )。在制片过程中不要用自身发射荧光或抑制荧光发生的物质作固定剂和封埋剂,最好是冰冻切片。

实验结果:细胞核 DNA 呈亮绿色 黄绿色荧光,细胞质和核仁的 RNA 成橘红色荧光。

## 4.2 暗视野显微镜

#### 【目的要求】

1. 了解暗视野显微镜的基本构成和基本原理。
2. 初步掌握暗视野显微镜的调节步骤和使用。

#### 【实验原理】

暗视野显微镜是以丁达尔现象为基础,利用抛物面型等特殊聚光器进行斜射照明。因光源的中心光束不能直接进入物镜,所以视野黑暗,被检物体表面因斜射照明发生衍射及反射而光亮可见。暗视野显微镜能观察到普通明视野显微镜观察不到的  $0.2 \sim 0.004 \mu\text{m}$  之间的微粒子的存在和运动,但不能看清其结构(图 1-9)。

#### 【实验用品】

1. 器材:暗视野显微镜、载玻片、盖玻片、擦镜纸、香柏油(或液体石蜡)、二甲苯等。

2. 材料:口腔黏膜上皮细胞。

#### 【方法与步骤】

1. 把暗视野聚光器转到工作位置或装在载物台下的聚光器支架上。
2. 打开光源,照明光源要用强光源,但又要防止直射光线进入物镜,通常以溴

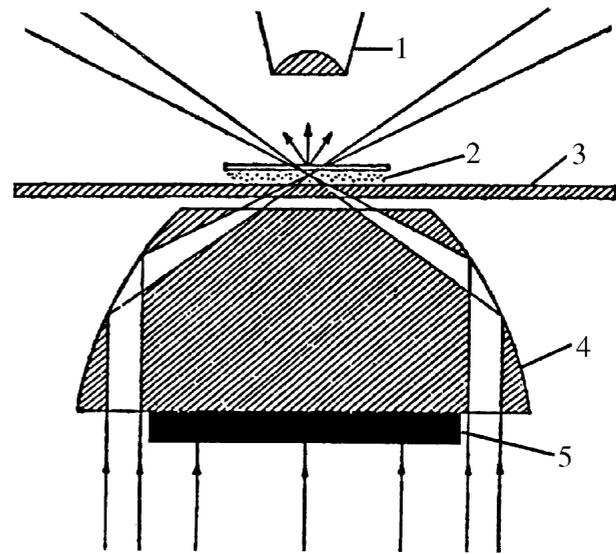


图 1-9 抛物面型暗视野聚光器的光路图

1. 物镜;2. 标本;3. 载玻片;  
4. 聚光器;5. 遮光片

钨灯作为照明光源。

3. 将制备的标本放置在载物台上,调整聚光器升降旋钮,将聚光器焦点对准被检物体。聚光器的光轴要与显微镜的光轴位于同一轴线上。

4. 使用油浸暗视野聚光器时,要在聚光器与载玻片之间滴加香柏油,使两者紧密接触。

#### 【注意事项】

1. 使用暗视野聚光器时,要与物镜合理匹配。暗视野聚光器的数值孔径必须大于物镜的数值孔径。否则,会因物镜孔径角大于暗视野聚光器所形成的照明光束中心暗区的角度,而使部分照明光线射入物镜,破坏或降低了暗视野的照明。

2. 暗视野聚光器有抛物面型和心型两种,前者  $N.A.$  值较低;后者  $N.A.$  值较高,通常用于油浸。使用油浸暗视野聚光器时,要在聚光器与载玻片之间滴加香柏油,使两者密接。否则,照明光线在聚光器上面进行全反射,不能到达被检物体,从而得不到暗视野照明。

3. 载玻片厚度以  $0.8 \sim 1.2 \text{ mm}$  为适宜。因照明光束经暗视野聚光器后,产生空心照明光锥,即中心为暗区,而反射光的焦点在聚光器上透镜表面之上很短的距离。

4. 载玻片和盖玻片应清洁无划痕,否则会引起漫反射而影响暗视野的照明。

5. 光源亮度要强。

### 4.3 相差显微镜

#### 【目的要求】

1. 了解相差显微镜的基本构成和基本光路。

2. 初步掌握相差显微镜的调节步骤和使用。

#### 【实验原理】

人的眼睛只能感觉光波的波长(颜色)和振幅(亮度)的变化。活的细胞或未染色的标本多为无色透明,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,所以用普通的光学显微镜难于观察。但是,即使是近于无色透明的细胞或标本,各部分的折射率或厚度也会有微小的差异。当光波通过时,在各部分的滞留时间就会不同,即光程会有微小的不同,因而光波的相位会发生微小的变化。

相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位,并且利用光的衍射和干涉现象,把相差变成振幅(明暗)差。同时它还吸收部分直射光线,以增大其明暗的反差。所以人的眼睛就能够分辨活细胞或未染色标本的细微结构(图 1-10)。

相差显微镜和普通显微镜的主要不同之处是用环状光阑代替可变光阑,用带相板的物镜代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。

1. 环状光阑:它是由大小不同的环状孔形成的光阑,与聚光镜在一起组成转