

21世纪高等院校教材
国家理科基地教材

细胞生物学实验教程

王金发 何炎明 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是王金发教授主持的《细胞生物学》立体化教材建设项目的实验教材。全书包括 12 章共 64 个实验,涵盖了部分经典的细胞生物学实验,又新增了一些与现代细胞生物学和分子生物学相关的新技术,内容包括光学显微镜技术、电子显微镜技术、细胞的形态结构、细胞化学、细胞生理、细胞分裂与染色体畸变、染色体技术与核型分析、细胞和组织培养技术、细胞化学成分分离、蛋白质及核酸的定位与检测、细胞工程技术以及流式细胞技术、共聚焦显微技术、细胞凋亡检测技术等。

本书可供综合性大学、农林、医学、师范院校本科生和研究生的细胞生物学实验课教学使用,也可作为相关研究人员的参考用书,由于本书实验内容较多,在使用时可根据自身条件酌情选择。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验教程/王金发 何炎明主编. —北京:科学出版社, 2004.9

21 世纪高等院校教材·国家理科基地教材

ISBN 7-03-013486-9

I. 细… II. 王… 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 050310 号

责任编辑:单冉东 谢灵玲 贾学文/责任校对:张 琪

责任印制:安春生/封面设计:陈 敬

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 9 月第 一 版 开本:850×1168 1/16

2006 年 1 月第五次印刷 印张:13

印数:14 501—20 500 字数:293 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

编者名单

王金发

何炎明

刘 兵

戚康标

冯冬茹

张利红

张为民

前 言

细胞生物学是高校生命科学的主干课程之一，是一门实验性很强的学科。生命科学的许多重大发现与细胞生物学实验技术的不断创新、发展是分不开的。因此，学习和掌握细胞生物学最基本的技术和最新的实验方法，对于从事生命科学研究的工作者来说是非常重要的和完全必要的。

由于细胞生物学已成为生物学重要的前沿学科，其发展速度之快可谓日新月异，各种研究的新方法、新技术如雨后春笋层出不穷。各学科之间的相互渗透、相互依存紧密相连，如细胞生物学与分子生物学、分子遗传学等实验技术之间就具有很强的依存性和相融性。细胞生物学实验技术的巨大变化，将推动细胞生物学向着更深的层次发展。我们为了紧跟学科发展的趋势，把握学科前进的方向，适应学科发展的需要，将多年来在教学和科研实践中积累及编写的细胞生物学技术编写成《细胞生物学实验教程》一书。旨在让学生能掌握细胞生物学研究的基本操作技能和新的实验技术，从细胞生物学的角度分析生物学中的问题，为独立进行研究打下基础。

本书是王金发教授主持的“细胞生物学立体化教材建设项目”的实验教材。全书共有 64 个实验，内容较丰富，知识面广，既包括经典的经典实验，又新增了不少与现代细胞生物学和分子生物学相关的新技术，如电穿孔和电融合技术、反转录病毒载体介导的基因转导技术、胚胎干细胞的培养和体外分化技术、流式细胞技术、细胞显微注射、共聚焦显微技术、细胞凋亡检测技术等。这些实验内容新颖、技术先进、可操作性强，对培养学生的动手能力、分析问题和解决问题的能力很有帮助。

本书由王金发教授统筹组织和审定，由编写组成员通力合作而成：第一至四章由戚康标编写；第五至七章由何炎明编写；第八章由何炎明、张利红编写；第九、十二章及附录由刘兵编写，并对全书进行文字编辑和校对；第十、十一章由张利红、张为民编写；冯冬茹参加了部分实验的初稿编写工作。

本书在编写过程中得到中山大学“国家理科基础科学研究与教学人才培养生物学基地”建设基金、中山大学博学工程项目资助，中山大学实验教学研究改革项目基金资助，在此表示感谢。

由于编者的水平有限，书中难免有误，恳请广大读者给予批评指正。

编 者

2004 年 3 月

目 录

第一章 光学显微镜技术	(1)
实验 1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法	(1)
实验 2 特殊显微镜的原理和使用	(7)
实验 3 显微摄影技术	(12)
实验 4 光学显微标本的制作技术	(22)
第二章 电子显微镜技术	(30)
实验 5 透射电子显微镜	(30)
实验 6 透射电子显微镜样品制备	(33)
实验 7 扫描电子显微镜	(37)
实验 8 扫描电子显微镜样品制备	(39)
第三章 细胞的形态结构	(41)
实验 9 细胞形态结构与几种细胞器的观察	(41)
实验 10 液泡系和线粒体的活体染色	(42)
实验 11 植物细胞骨架的光学显微镜观察	(45)
实验 12 细胞骨架的免疫荧光显示	(46)
实验 13 细胞的超微结构	(50)
实验 14 细胞的显微测量	(53)
第四章 细胞化学	(56)
实验 15 DNA 的细胞化学——Feulgen 反应	(56)
实验 16 RNA 的细胞化学——Brachet 反应	(58)
实验 17 细胞中多糖和过氧化物酶的定位	(59)
实验 18 细胞中酸性磷酸酶的定位	(61)
实验 19 细胞中碱性磷酸酶的定位	(63)
第五章 细胞生理	(65)
实验 20 小鼠巨噬细胞吞噬的观察	(65)
实验 21 胞饮作用	(66)
实验 22 细胞膜的通透性	(67)
实验 23 细胞电泳	(69)
第六章 细胞分裂与染色体畸变	(73)
实验 24 细胞的无丝分裂与有丝分裂	(73)
实验 25 细胞减数分裂	(75)
实验 26 环境因素及辐射诱变染色体改组的观察	(78)

第七章 染色体技术与核型分析	(81)
实验 27 植物染色体标本的制备和观察	(81)
实验 28 动物骨髓细胞染色体标本的制备	(83)
实验 29 人体外周血淋巴细胞培养与染色体标本制备	(85)
实验 30 人类染色体 G 带技术	(88)
实验 31 植物染色体分带技术	(89)
实验 32 人类体细胞染色体组型分析	(91)
实验 33 染色体核仁组织区 (NOR) 的显示	(93)
实验 34 姊妹染色单体色差分析技术	(95)
第八章 细胞和组织培养技术	(98)
实验 35 植物组织培养技术	(98)
实验 36 原生质体的分离和培养	(101)
实验 37 植物体细胞杂交——原生质体的融合	(103)
实验 38 动物细胞原代培养	(105)
实验 39 传代细胞培养	(106)
实验 40 细胞的冻存与复苏	(108)
实验 41 哺乳动物胚胎干细胞的培养和体外分化	(110)
第九章 细胞化学成分的分离	(115)
实验 42 细胞核与线粒体的分级分离	(115)
实验 43 完整叶绿体的分离	(116)
实验 44 中期染色体的分离纯化	(119)
实验 45 动物细胞基因组 DNA 的提取	(121)
实验 46 植物基因组 DNA 的提取	(122)
实验 47 细胞和组织总 RNA 的提取	(124)
实验 48 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段	(125)
第十章 蛋白质、核酸的定位与检测	(128)
实验 49 地高辛标记探针的 Southern 杂交.....	(128)
实验 50 放射性标记探针的 Northern 杂交.....	(132)
实验 51 Western 印迹法 (蛋白质印迹法)	(136)
实验 52 蛋白质与蛋白质相互作用检测——酵母双杂交筛选	(140)
实验 53 原位 PCR	(143)
实验 54 用 ABC 法进行蛋白质的免疫定位	(147)
第十一章 细胞工程技术	(150)
实验 55 鸡血细胞的体外融合	(150)
实验 56 磷酸钙沉淀法将 DNA 导入细胞	(153)
实验 57 电穿孔和电融合技术	(154)
实验 58 反转录病毒载体介导的基因转导	(156)

实验 59 细胞显微注射技术	(158)
第十二章 其他技术	(163)
实验 60 细胞放射自显影	(163)
实验 61 流式细胞技术	(164)
实验 62 荧光标记技术	(170)
实验 63 细胞凋亡的检测	(172)
实验 64 共聚焦显微技术及去旋技术	(174)
主要参考文献	(187)
附录	(188)
附录 1 一些常用的换算	(188)
附录 2 常用试剂及溶液的配制和使用	(188)
附录 3 光学仪器保养与清洁的要点	(194)
附录 4 常用缩写汇编	(194)
附录 5 常用细菌培养基的配方	(197)

第一章 光学显微镜技术

显微镜是在人们认识到凸透镜放大作用的基础上发明的。据历史记载，12 世纪阿拉伯人阿尔海琴已会磨制透镜。1604 年荷兰眼镜商詹森制造了第一台放大率不超过 10 倍的复式显微镜。半个多世纪后，英国物理学家胡克创制了第一架具有科学研究价值的显微镜，首次观察了木栓的显微图像，并发现了细胞。真正观察到活细胞的是荷兰科学家列文虎克，他用自制的显微镜观察到了池塘水中的原生动物，还有人和哺乳类动物的精子、细菌等。可以说没有显微镜的发明就没有细胞的发现。

随着现代科学技术的发展，显微镜的种类越来越多，性能更加完善，使用范围也越来越广泛，不仅可以用来观察细胞形态和内部结构，而且，还可以通过与其他技术的结合，进行细胞化学成分的定位、定性、定量以及物质代谢、细胞生理、免疫和遗传等功能方面的研究，是细胞生物学研究中用途最广的仪器之一，没有它也就无法打开生物界的微观大门。因此，了解各种普通光学显微镜及其结构原理和操作方法具有重要的作用和意义。本章将介绍常用的普通光学显微镜和特殊显微镜的结构、原理、应用以及显微摄影技术。

实验 1 普通光学显微镜的构造原理及使用方法

【实验目的】

- (1) 熟悉普通光学显微镜的主要结构和基本性能。
- (2) 掌握低倍镜、高倍镜和油镜的正确使用方法。
- (3) 初步了解光学显微镜的维护方法。

【实验原理】

普通光学显微镜 (microscope) 是最通用的一种光学显微镜。利用光线照明，标本中各点依其光吸收 (即光的振幅发生变化) 的不同而在明亮的背景中成像。它由物镜、目镜、聚光镜、光源、载物台和支架等部件组成。其中聚光镜用于调节显微镜的照明，物镜和目镜是放大微小物体成像的主要部件。其基本成像原理是：目镜、物镜、聚光器各自相当于一个凸透镜，被检标本置于聚光器与物镜之间，物镜可使标本在物镜的上方而形成倒立的放大实像 (倒像)。目镜将此倒像进一步放大成像于人眼的视网膜上，形成一个直立的实像 (正像)。显微镜中放大的倒立的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 250mm 处 (图 1-1)。

【实验仪器、材料和试剂】

普通光学显微镜、擦镜纸、动植物组织细胞装片、香柏油、二甲苯。

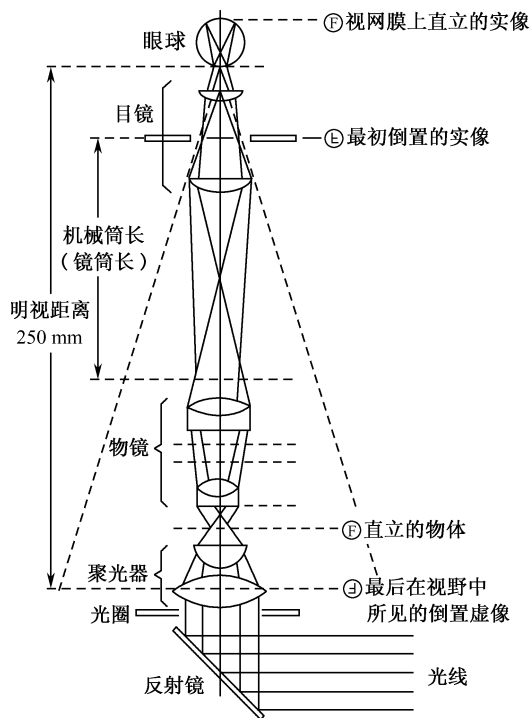


图 1-1 光学显微镜的放大原理及光路图

【实验内容与方法】

(一) 普通光学显微镜的基本构造

光学显微镜主要由三部分组成：机械部分、光学部分和照明部分（图 1-2）。

1. 机械部分

(1) 镜座 (base)：是显微镜的基座，起稳定和支持整个镜身的作用。有的显微镜在镜座内装有照明光源等构造。

(2) 镜柱 (pillar)：连接镜座和镜臂的短柱。

(3) 镜臂 (arm)：是支持镜筒和镜台的在镜柱上方弯曲的部分，拿镜时手握此臂，方便搬动。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有一可活动的关节叫倾斜关节，可使镜臂做适当倾斜，便于观察。使用时倾斜度一般不应超过 45° ，否则光镜重心偏移而容易翻倒。镜筒倾斜式显微镜由于镜臂和镜柱连为一体，故无此关节。

(4) 镜筒 (light tube)：位于镜臂前方的圆筒状结构，上端安装目镜，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（图 1-2），单筒式又分直立式和倾斜式两种，而双筒式的镜筒均为倾斜的。

(5) 转换器 (revolving nosepiece)：圆盘状，在镜筒下方，其上装有 3~4 个放大倍数不同的物镜，可以按顺时针或逆时针方向自由旋转。转换器的内缘有一“T”形卡，用于对准

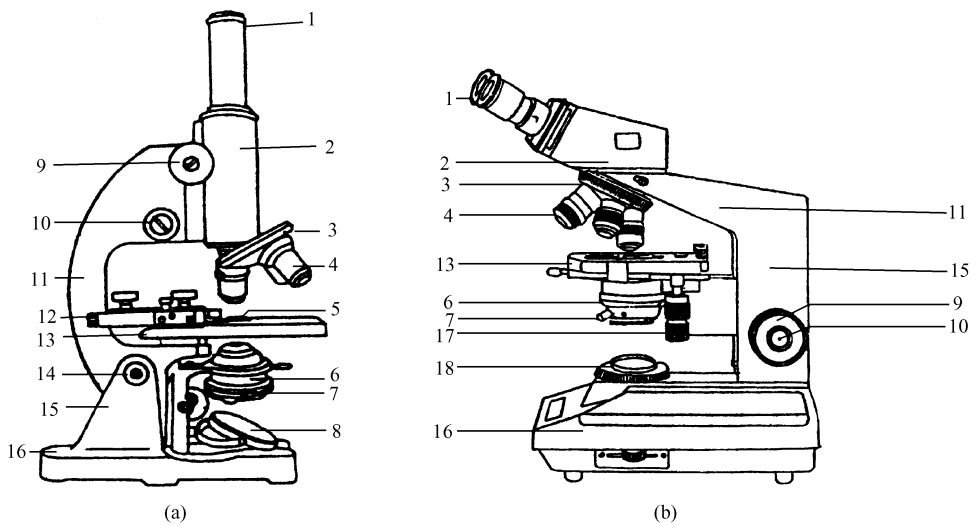


图 1-2 普通光学显微镜的结构示意图 (引自高文和等, 2001)

(a) 单目显微镜; (b) 双目显微镜

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. 标本移动器螺旋; 18. 灯室

和固定物镜位置, 转动旋转盘可使不同的物镜到达工作位置, 使物镜和光轴同心 (合轴)。

(6) 载物台 (stage): 又称平台, 位于镜筒的下方, 方形或圆形, 放置玻片标本用。载物台的中央有一圆形通光孔, 两旁各有一压片夹。有的载物台上装有标本移动器, 移动器上装有弹簧夹, 用于固定标本片。移动器的一侧有两个旋钮, 转动旋钮可使玻片前后左右移动, 以方便寻找观察目标。在移动器上还附有一纵横游标尺, 用于计算标本移动的距离和确定标本的位置。

(7) 调节器 (regulator): 位于镜臂的上端或下端, 有一对大小旋钮, 为调节焦距之用。大旋钮为粗调节器, 转动粗调节钮可使镜筒 (或载物台) 升降, 调节焦距。旋转一周可使镜筒 (或载物台) 升降 10mm。一般用于低倍镜调焦。小旋钮为细调节器, 转动细调节钮可使镜筒 (或载物台) 缓慢升降, 每旋转一周约使镜筒 (或载物台) 升降 0.1mm。适用于高倍镜、油镜或分辨物像清晰度调焦。

2. 照明部分

(1) 反光镜 (reflecting mirror): 位于载物台下方, 镜柱前面的一个圆镜。镜的一面为平面, 另一面为凹面。平面镜聚光力弱, 适于强光源和平行光源。凹面镜聚光力强, 适用于弱光源或散射光源。反光镜的方位可以随意调节。较新的双筒光镜光源通常装在光镜的镜座内, 通过按钮控制开关, 镜座侧面有一滑动键或旋钮, 可调节光线强弱。

(2) 聚光器 (condensor): 在载物台下方, 由一组透镜组成, 可使反射光线聚集于标本上。一般在镜柱一侧有一旋钮, 可使聚光器升降, 与物镜配合使用。

(3) 光圈 (aperture): 在集光器下方, 由一组活动金属片组成, 构成一个可开可缩的孔。

在其外侧有一小柄，可以调节控制光线通过。在光圈的下方常装有滤光片架，可以放置不同颜色的滤光片。

3. 光学部分

(1) 目镜 (eyepiece): 又称接目镜，短圆筒状，装在镜筒上端，在目镜的侧面刻有放大倍数，每台显微镜常备有 3~4 只放大倍数不同的目镜，如 5×、10×、15×等，在使用时，可根据不同的需要选择倍数的大小，最常用的是 10×目镜。通过目镜就能观察到被放大的物像。

(2) 物镜 (objective): 装在物镜转换器上的一组镜头，一般有低倍镜、高倍镜、油镜三种。每个物镜上刻有相应的标记，低倍镜筒上刻有 10×或 15×等标志，高倍镜筒上刻有 40×或 45×标志，油镜上一般为 100×。N A 表示镜口率，镜口率反映镜头分辨力的大小，其数字越大，表示分辨力越高。各种物镜的性质见表 1-1。

表 1-1 标准物镜的性质比较

放大倍数	镜口率 (NA)	分辨力 / μm	工作距离 /mm
10	0.28	1.00	6.50
40	0.65	0.42	0.60
100	1.30	0.21	0.20

(二) 普通显微镜的性能和质量

光学显微镜的性能和质量的高低可受分辨率、放大率、镜口率、焦点深度和视场宽度等的影响，这些指标都有一定限度，彼此间相互作用又相互制约，若改善或提高某方面的性能，都会使另一性能降低。

1. 分辨力

分辨力 (resolving power) 又称分辨率或分辨本领，指显微镜或人眼在 25cm 的明视距离处，能清楚地把两个被检细微物点分开的最小距离的能力。这两点之间的距离即为其分辨力，这个距离越近，其分辨力越高。据测定，人眼的分辨力约为 100 μm ，而光学显微镜的分辨力可达 0.2 μm 。显微镜的分辨力依下列公式来计算：

$$R = 0.61 \lambda / \text{NA} \quad (\text{NA} = n \cdot \sin \theta)$$

式中，R 为分辨力； λ 为照明光源的波长，白光约为 0.5 μm ；NA 为镜口率；n 为介质的折射率，n 的最大值为 1.5； $\sin \theta$ 为透镜视锥半顶角的正弦。

2. 放大率

放大率是光学显微镜的另一个重要参数，光镜放大倍数的计算公式如下：

$$\text{实物放大倍数} = \text{物镜放大倍数} \times \text{目镜放大倍数}$$

光学显微镜常用的最大放大倍数一般为 1 600 倍。物镜放大率是对一定镜筒长度而言的，镜筒长度变化后，不仅放大率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此使用显微镜时，不能任意改变镜筒的长度。一般国际上将光学显微镜的标准镜筒长度定为 160mm，并标刻在物

镜的外壳上。

3. 焦点深度

当把焦点对准某一物点时，不仅位于该点平面上的各点都可看得清楚，而且在平面的上下一定厚度内也能看得清楚，这个清晰部分的厚度就是焦点深度。焦深与总放大率和镜口率成反比，因此高放大率和高镜口率显微镜的焦深就浅，不能看到标本的全厚度，必须调节螺旋改变焦距，并仔细地从上到下进行观察。

4. 视场亮度

视场亮度是指光学显微镜的整个视场的明暗程度。在使用光镜时，不更换物镜和目镜的情况下，视场亮度大，观察到的图像也就大。

(三) 显微镜的使用方法

1. 用前的准备工作

(1) 打开镜箱，右手握住镜臂，左手托住镜座，小心地把显微镜从镜箱内取出，轻轻地放在实验桌上。

(2) 检查显微镜的各部件是否完整和正常，如发现有部件损坏或出现故障，应立即停止使用，待排除故障或修复后，才能继续操作。

2. 低倍镜的使用

(1) 准备：将显微镜放于前方略偏左侧，必要时使镜筒倾斜（有的显微镜本身已经倾斜）以便观察。转动粗调节钮，将镜筒略升高（或将载物台下降）使物镜与载物台距离拉开，以免物镜与载物台相碰。然后旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔（可听到“咔哒”声）。

(2) 对光：打开光圈，上升聚光器，双眼同时睁开，以左眼向目镜内观察，双手并用，左手调焦，右手移片或绘图记录，同时调节反光镜的方向，使视野内的光线均匀，亮度适中。

(3) 放标本片：标本片的盖片朝上，将标本片放到载物台前方，然后推到物镜下面，用压片夹压住，如有标本移动器，可用上面的弹簧夹夹住标本片，然后把要观察的部分移到通光孔的正中央。

(4) 调节焦距：从显微镜侧面注视物镜镜头，同时旋转粗调节钮，使镜筒缓慢下降（或镜台上升），低倍镜的镜头端与玻片间的距离约 5mm 时，再用左眼从目镜里观察视野，左手慢慢转动粗调节钮，使镜筒缓缓上升，直至视野中出现物像。如物像不太清晰，可转动细调节钮，使物像达到最清晰为止。

如果按上述操作步骤仍看不到物像时，可能由以下原因造成：

(1) 转动调节钮太快，超过焦点，应按上述步骤重新调节焦距。

(2) 物镜没有对正，应对正后再观察。

(3) 标本没有放到视野内，应移动标本片寻找观察对象。

(4) 光线太强，尤其观察比较透明的标本或没有染色的标本时，易出现这种现象，应将光线调暗一些后再观察。

3. 高倍镜的使用

(1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到清晰物像。

(2) 将需要观察的部分移到视野的中央。

(3) 眼睛从侧面注视物镜，用手移动转换器，换高倍镜。

(4) 眼睛向目镜内观察，同时微微上下转动细调节钮，直至视野内看到清晰的物像为止。

如按上述操作仍看不到物像时，可能由下列原因造成：

(1) 观察的部分没在视野内，应在低倍镜下寻找到后，移到视野中央，再换高倍镜观察。

(2) 标本片放反了，应把标本片放正后，再按上述步骤操作。

(3) 焦距没调好，应仔细调节焦距。

有的显微镜高倍镜与低倍镜不配套，从低倍镜转换高倍镜时，往往转不过来或撞坏标本，如遇到这种情况，可把镜筒略升高（或载物台下降），直接用高倍镜调焦方法是：从侧面注视物镜，调节粗调节钮，使高倍镜头下降至与标本片最短距离，再观察目镜视野，慢慢调节细调节钮，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。如需要更换标本片时，应该先把镜筒升高（或载物台下降），然后把标本片移到载物台前方，再取下。

4. 油镜的使用方法

(1) 先按低倍镜到高倍镜的操作步骤找到物像，把要放大观察的部分移到视野中央。

(2) 把高倍镜移开，在标本片上滴一滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，可来回调动细调节钮，即可看清物像。如仍看不清，应按上述步骤可重复。

(3) 找到物像后，再调节聚光器和光圈，选择最适光线。

(4) 油镜使用完毕后，把镜头上升约 10mm，并转到一边，用擦镜纸把镜头擦净。如仍擦不干净，可用擦镜纸蘸少许擦镜水或二甲苯轻擦，然后再用干净的擦镜纸擦一遍。

(5) 有盖片的标本片，可用擦镜纸蘸少许擦镜水或二甲苯，把油擦净。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油。方法是：先把一小张擦镜纸盖在油滴上，再滴上二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净。也可以在二甲苯中把油洗去晾干。

5. 使用练习

(1) 低倍镜使用练习：取一张 A 字片，用低倍镜观察。练习对光、调焦，并注意观察物像与玻片移动方向是否一致，镜下观察的字母是正像还是反像？

(2) 高倍镜使用练习：取一张羊毛交叉片（染成红色），先用低倍镜观察，找到羊毛交叉点，移到视野中央，换高倍镜观察。调节焦距，注意观察上下羊毛的清晰度。

(3) 油镜使用练习：取一张人血涂片，先用低倍镜、高倍镜观察，再练习用油镜观察。注意比较三种物镜的放大倍数和分辨率有何不同。练习分辨红细胞、白细胞和淋巴细胞。练习擦洗油镜头和标本片。

(四) 使用显微镜的注意事项

(1) 取显微镜时必须右手握住镜臂，左手托镜座，切勿一手斜提，前后摆动，以防镜头或其他零件跌落。

(2) 观察标本时，显微镜离实验台边缘应保持一定距离（5cm），以免显微镜翻倒落地。镜柱与镜臂间的倾斜角度不得超过 45°，用完立即还原。

(3) 使用时要严格按步骤操作, 熟悉显微镜各部件性能, 掌握粗、细调节钮的转动方向与镜筒升降关系。转动粗调节钮向下时, 眼睛必须注视物镜头。

(4) 观察带有液体的临时标本时要加盖片, 不能使用倾斜关节, 以免液体污染镜头和显微镜。

(5) 粗、细调节钮要配合使用, 细调节钮不能单方向过度旋转, 调节焦距时, 要从侧面注视镜筒下降, 以免压坏标本和镜头。

(6) 用单筒显微镜观察标本, 应双眼同时睁开, 左眼观察物像, 右眼用以绘图, 左手调节焦距, 右手移动标本或绘图。

(7) 禁止随意拧开或调换目镜、物镜和聚光器等零件。

(8) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙东西擦拭, 以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。

(9) 凡有腐蚀性和挥发性的化学试剂和药品, 如碘、乙醇溶液、酸类、碱类等都不可与显微镜接触, 如不慎污染时, 应立即擦干净。

(10) 实验完毕, 要将玻片取出, 用擦镜纸将镜头擦拭干净后移开, 不能与通光孔相对。用绸布包好, 放回镜箱。切不可把显微镜放在直射光线下曝晒。

【作业】

(1) 填图注明光学显微镜各部件的结构名称。

(2) 怎样区分低倍镜、高倍镜和油镜?

(3) 简述使用低倍镜、高倍镜和油镜的主要步骤。

【思考题】

(1) 为什么使用高倍镜和油镜时, 必须从低倍镜开始?

(2) 显微镜下看到的物像是正像还是反像? 物像与玻片的移动方向是否一致? 为什么?

(3) 简述使用显微镜的注意事项。

实验 2 特殊显微镜的原理和使用

光学显微镜在细胞生物学研究领域发挥着越来越重要的作用, 随着现代生物学技术与光学显微镜技术的发展, 光学显微镜的种类也越来越多, 现在除了普通光学显微镜以外, 已经研究出多种有特殊功能的光学显微镜, 如相差、暗视野、荧光、干涉、微分干涉反差等显微镜。由于它们都是在显微镜基本设计上发展出来的衍生装置, 所以有不少设计是在基本设备上换用附设的专用组件或添加特殊专用装置, 就成为能进行各种用途的一机多用镜, 使光学显微镜的应用技术从单纯形态学研究扩展到动态研究细胞结构与功能的关系领域。因此, 简单了解这些特殊显微镜的原理、特点与使用方法, 了解它们之间的差别和联系, 对细胞生物学的研究将会带来许多方便和帮助。

【实验目的】

通过演示和参观等形式掌握各种特殊显微镜的原理、构造及其使用方法。

【实验原理】

(一) 暗视野显微镜

暗视野显微镜 (dark ground microscope) 和普通显微镜相似, 只不过是利用暗视野照明法进行镜检, 它不能直接观察到照明光线, 只能观察到被检物体所反射或衍射的光线。因此, 视野呈黑暗的背景, 而被检物体则呈现明亮的像。

根据光学上丁达尔 (Tyndoll) 现象, 微尘颗粒在强光穿过的情况下, 不能为肉眼所见。若使光线斜射它们, 则因光的反射或衍射, 尘粒似乎增大了体积, 便成为可见。例如, 一束强光射进昏暗的房间时, 我们可以在光束中见到超出人眼分辨的灰尘颗粒。暗视野显微镜就是依据此原理设计的。

暗视野照明法通用的有两种方式。

1. 中心遮光法

用中央纸板遮去中央光束, 然后将这样的纸板放在聚光器下面的滤光片支架上, 修整遮光面积和纸板大小, 使聚集在聚光器焦点的直接照明光线的中央光束遮掉, 视野基本黑暗, 而保证侧面斜射过来的光照亮被检物。

2. 暗视野聚光器法

常用抛物面聚光器, 中央有黑挡板以遮光, 并使落在抛物面上的光线无法反射出来, 当暗视野聚光器的数值孔径大于物镜的数值孔径时, 照明光线不能进入物镜, 只有标本的散射光线进入物镜。使用时将一般显微镜的聚光器换成暗视野聚光器, 做合轴调节, 在聚光器与载玻片之间加一滴香柏油, 即可进行调焦观察, 用毕后及时擦净油。使用时应注意: 载玻片、盖玻片都应洁净无痕, 否则散射光增多而使背景发亮; 载玻片厚度应在 1.1mm 以内, 否则光线将在载玻片内会聚而达不到标本。

暗视野显微镜能观察到 $0.2\sim 0.004\mu\text{m}$ 的亚微颗粒, 看到细胞在明视野照明下无法分辨的结构, 但无法分辨物体的内部结构, 因而它主要用来观察活细胞中微粒的运动, 观察单细胞、硅藻、放线菌、细菌的线状结构如纤维和鞭毛等。

(二) 相差显微镜

相差显微镜 (phase contrast microscope) 是能将物体本身的相位差 (或光程差) 转换为振幅 (光强度) 变化的显微镜。人的眼睛只能鉴别可见光的波长和振幅的变化, 但活的生物多为无色透明, 当光线通过时, 波长和振幅很少发生变化, 而生物材料各部分之间以及与环境之间往往有折射率的差别, 光线透过后可产生相位的改变。20 世纪 30 年代初期, 德国物理学家泽尼克根据“相衬法”原理, 首先设计并于 1932 年制造了第一台相差显微镜, 能将看不见的相位变化转变为看得见的振幅变化。

当光波通过活细胞的折射率不同的部位时, 一部分仍为相位和振幅相同的直射光, 另一部分由于光的衍射现象而向周围侧方发散出成为衍射光。当直射光和衍射光同时到达一点时, 两者互相干涉, 形成合成波, 合成波的强度取决于两光波的振幅和相差。为了利用两种光波

的干涉，在相差显微镜中设有 2 个特殊的装置：环状光阑与相板。直射光一般比衍射光要强很多，为了让衍射光对直射光有影响，要使直射光强度减弱。环状光阑和相板中环状金属涂料在光路中重叠（即同轴、同轴环）后，直射光经金属吸收、强度减至和衍射光差不多。相板的其余部分为比较厚的透明材料，使衍射光产生光程差的作用。一般设计为光程差 $1/4$ 周期（即 $\pi/4$ ）的厚度。假定其生物样品能使经过它们的光产生 $\pi/4$ 的光程差，这样的 2 个 $\pi/4$ 相加使衍射光产生 $\pi/2$ 的光程差。这时经过样品的衍射光 and 不经样品的直射光正好为波峰和波谷相遇，振幅为零，则样品呈黑暗。而某些生物样品若使衍射光推迟光程为 $3\pi/4$ 的，再加上相板推迟的 $\pi/4$ ，和直射光的光程相差正好为 π ，即正好为波峰与波峰相遇，合成波有 2 倍的振幅，样品区为最明亮。一般生物样品中各种结构推迟光程的能力不同，但都在上述 2 个极端之间，这样就会出现明暗程度不同的差别。

所以，相差显微镜的原理是将两种光程差（相位之差）转变为明暗之差，使不经染色的生物活样品由于对光程推迟的数值的不同而显示出明暗的差异。

在一台明视野显微镜上，装入具有环状光阑的聚光器和具有相板的相差物镜（常标有 pH 记号），就成为一台相差显微镜。环状光阑是一个不透明的玻璃圆盘中有一个透明的圆环，使光线只能从这圆环中通过，具有环状光阑的聚光器称为相差聚光器，相差聚光器设有几个直径不同的环状光阑，分别对应于不同放大倍数的相差物镜。相板位于物镜后焦平面上，在一个透明圆盘中有一暗色圆环，整个相板涂有相位推迟物质，使通过环状光阑经标本后产生的衍射光、散射光的相位推迟 $1/4$ 波长，这样若物体使直射光比衍射光超前 $1/4$ 波长，合起来有 $1/2$ 波长的正相差，干涉结果使物体像暗而背景亮，暗相差结果则相反。暗色圆环部分还涂有光吸收物质，吸收部分直射光。每一相差物镜都有相应的环状光阑，即聚光器的各个环状光阑的直径、宽度是和相应的相板是一样的，因此，每调换一次不同倍数的相差物镜时，都须要转换一个相应的环状光阑，并将两者互校对齐，具体调节时应使在物镜后焦面上环状光阑中透明圆环的像与相板中的暗色圆环互相吻合，这样可以达到使直射光和衍射光分离的目的。

相差显微镜的调试方法为：首先将 10 倍相差物镜旋入光路，同时将相差聚光器的环板转盘转到字母“O”处，将样品置于载物台上，聚焦样品，再用柯勒照明法调节聚光器；然后将相应于 10 倍相差物镜的聚光器环状光阑移入光路中，完全打开聚光器的孔径光阑；取下一个目镜，插入聚焦望远镜，旋松其上的固紧螺丝，前后抽动望远镜的目镜，使物镜相板与聚光器环板成像清晰，再旋紧望远镜的固紧螺丝；把调节扳手插入相差聚光器转盘两后侧的孔内，调节使环板的亮环与相板的暗环重合；取出望远镜，换入目镜即可进行相差观察。

相差显微镜主要用于观察活体细胞、不染色的组织切片或减少反差的染色标本，但切片都不宜过厚，一般以不超过 $20\mu\text{m}$ 为宜，载玻片须均匀一致，厚度在 1mm 左右，盖玻片也以 $0.17\sim 0.18\text{mm}$ 的厚度为宜。

（三）荧光显微镜

荧光显微镜（fluorescence microscope）是利用较短波长的紫外光照射标本，使样品受到激发，产生较长波长的荧光，可用来观察和分析样品中产生荧光的成分和结构、位置，观察的

主要荧光有自发荧光、染色荧光、诱发荧光、免疫荧光和酶诱发荧光等。原发荧光，或称一次荧光，是标本不经任何处理，在紫外线照射下发出的荧光；染色荧光，或称二次荧光，是标本经荧光染料处理后那些对荧光染料具有选择性吸收的部分经激发后发出的荧光。

高压汞灯或氙灯是常用的荧光激发光源，它们除产生紫外线外，还会产生很大的热量和各种波长的可见光，因此可在光路中加入吸热片和滤色镜，使在生物荧光显微技术中常使用的 $0.35\sim 0.40\mu\text{m}$ 范围内波长的紫外线通过。由于标本被激发和荧光的收集都是由同一物镜实现的，荧光效率与所用物镜的数值孔径的四次方成正比，用数值孔径较大的浸没物镜为好，而荧光亮度与目镜放大倍数的平方成反比，所以一般采用低倍目镜。

荧光显微镜与普通光学显微镜不同，它的光源不是起直接照明的作用，而是作为一种激发标本内的荧光物质的能源，荧光经物镜和目镜的放大后，在黑暗的背景下呈现彩色的荧光图像。

由于荧光显微镜灵敏度高，用极低浓度（ppm 级）荧光染料就可清楚地显示细胞内的特定成分，它不仅可观察固定的切片标本，而且还可以进行活体观察，如可以对活细胞内物质的吸收和运输，化学物质的分布与定位等；此外还可以与分光光度计结合成为显微分光光度计，对细胞内物质进行定量分析，其精确度高，可测得 10^{-15}g 的 DNA 含量。

荧光显微镜的使用方法，如 XSJ-2 型荧光显微镜，它的操作步骤为：首先将所需要观察的荧光染色标本放到载物台上，将 10 倍或 25 倍平场物镜转入光路，调节载物台纵横移动器，将所需观察部位移入光路，再转动滤色镜转换手轮将需要的滤色镜转入光路（激发滤色镜组编号可以转动手轮前的小窗读出），调节粗调和细调对焦，直到清晰地观察到荧光图像为止。

使用荧光显微镜时要注意：开启后 10min 达到最大的效率，汞灯点亮 15min 内不要关灯，一旦关灯，需等 3min 后才能重新开启，这样有助于保持灯的使用寿命；荧光镜检最好在暗室或半暗室中进行，摄影时曝光时间需要比一般的显微摄影时间加长数倍，并注意遮去紫外线的干扰；尽量观察新鲜处理的标本，其荧光强度较强。

（四）偏光显微镜

偏光显微镜（polarization microscope）是一种具有起偏振器、检偏振器和补偿器等装置的特殊显微镜，借助偏光显微镜可以观察生物标本是否为双折射物体，并可判断双折射率的正负，推断物体内部分子的排列。在生物学研究中，偏光显微镜主要用于观察有双折射性的结构，如纺锤体、骨骼、鳞片、牙齿等，还可鉴别脂肪、淀粉粒和某些蛋白质。

偏光显微镜中，在光源和聚光器之间装有可旋转的起偏器 P，在目镜筒下面装有检偏器 A，起偏器和检偏器都是由方解石制成的尼科尔棱镜。当 P 和 A 的两主截面夹角为 0° 或 180° 时，构成平行偏光镜，A 可透射来自 P 的所有线偏振光，视野最亮；当 P 和 A 的两主截面夹角为 90° 或 270° 时，两者构成正交偏光镜，A 不能透射来自 P 的线偏振光，视野是黑暗的；当两主截面夹角为其他值时，视野中显示不同程度的亮度。

在正交偏光镜位置，将一各向同性物体如玻璃置于载物台上，由于这种物体不能改变偏振光的振动方向，所以无论怎样旋转载物台，视野都是黑暗的。若将一各向异性物体置于正交偏光镜间，旋转载物台一周，会出现 4 次最亮位置和 4 次最暗位置。如果所用光源为白光，

则还会看到颜色，这主要是由于产生了干涉色，一定的干涉色总是对应于一定数值的光程差，从干涉色表中查出这种对应关系，在使用补偿器（是一种双折射物质，可连续调节产生一定值的光程差）的情况下，可确定标本双折射率的正负，从而进一步判断标本内分子的排列方式。

（五）干涉显微镜

干涉显微镜（interference microscope）是通过标本内和标本外的相干光束产生干涉，把经物体的相位差转换成振幅变化的显微镜，使用干涉显微镜可以测量光程差，并在知道标本面积后，即可算出标本的干重。利用此法，可以追踪测量活细胞在不同生活状态下的干重，但细胞各点的相位差是不均一的，可以利用扫描显微干涉仪，通过扫描方式逐点测量光程差，积分后给出这种不均质相位物质的总干重。

微分干涉反差显微镜（简称 DIC 显微镜）是一种特殊类型的干涉显微镜，特点是将相干光束分开的距离相当小，仅为 $1\mu\text{m}$ 甚至更小些，因而两束相干光都通过标本，再加上两者之间有微小的相位差别，使得观察的像为立体的三维像，有浮雕感。DIC 显微镜可以观察活的或未染色标本的精细结构，具有相差显微镜所不能达到的某些优点，是一种很有前途的光学显微镜。

（六）体视显微镜

体视显微镜（stereo microscope）外表像双目显微镜，用以观察小生物体局部或小的器官组织及细胞群等，还可用于对小的组织器官和小生物体的解剖。

一般体视显微镜的两个目镜的宽度和屈光度可以调节，两个目镜下面各有一组物镜，镜身装有调焦器，较好的体视显微镜的物镜组可以连续改变焦距或改变数种放大倍数，并由变位器控制。镜台中央正对物镜之下有一块可以拆卸并翻转的一面白一面黑的圆瓷板，供观察不同颜色物体时选择明暗背景之用，且便于洗涤。好的体视镜有两套采光装置，一套为自然光源，一套为人工光源，在使用人工光源时，圆瓷板可换成透明玻璃成为透明镜台。

普通显微镜的造像是倒立的，但体视显微镜所观察到的是正立像，像具有立体感，但放大倍数一般不高，最高为 200 倍。

（七）倒置显微镜

倒置显微镜（inverted microscope）是一种为适应生物学中大量发展的组织细胞离体培养工作的显微观察的需要而发展起来的一种光学显微装置。它的特点是能直接对培养皿、培养瓶中的标本进行显微观察，它的物镜、物体和光源的位置刚好与经典的显微镜颠倒，因而称为“倒置”。

高档的倒置显微镜，由于为了观察具有较厚瓶底的培养瓶（皿）中的细胞，常配备有长工作距离的物镜和聚光器，附设 40 倍相差或微分干涉反差的物镜、恒温装置供细胞培养和做环境条件实验用。

（八）共聚焦显微镜

共聚焦显微镜（cofocal microscope）是近年来新发展出来的一种显微镜，它利用的是共焦成像的原理，用一组透镜同时充当聚光器和物镜，光束自上而下经第一口径和透镜后聚焦在“物镜”后焦平面的标本上，从标本发出的光（可以是反射光也可以是荧光）再返经透镜聚焦在第二口径处，第二口径的大小直接决定所收集的发散光的多少。通过增大物镜的数值孔径，减小共焦孔径的大小，可以增强共聚焦的效果，使得观察视野中仅聚焦部位的物体像清晰，其余部位呈现黑色，给研究工作中的确认和分辨带来了极大的便利。

为了使入射光波束足够细，常采用不同波长的激光做照明光源；同时在有两个共聚焦光径的设计上，可让单色氩激光、双色氩和氦氖激光、三色氩/氩混合气体激光照射标本，从而使标本上不同标记色的物体得以显示；附设扫描软件，可以在三维空间对标本进行分析，这是通过对同一标本的不同层次的扫描结果综合后产生的；附设光度检测器，可对观察标本的成像进行阴暗程度的精确测定，从而推测其结构、密度等，这对于观察活体标本尤为有效。

Bio-Rad 公司研制的 MRC-600 系列激光扫描共焦成像系统，包括了多种现代化的成像、扫描、分析、计算工具，已为一些实验室所采用，这类显微镜必将为细胞生物学的研究提供更多更真实的信息资料。

【实验仪器、材料和试剂】

各种特殊显微镜、镜检的制片样品等。

【作业】

- (1) 简述各种特殊显微镜的主要功能和用途。
- (2) 荧光显微镜有哪些特有的装置，使用时的操作要点和注意事项有哪些方面？

实验 3 显微摄影技术

【实验目的】

了解和初步掌握自动曝光显微摄影的方法。

【实验原理】

显微摄影是通过摄影装置拍摄显微镜视野中物体影像的过程，它是必备的一项常用显微技术。它的基本原理是将标本的图像，通过显微镜投射到感光材料（胶卷）上而成为永久性记录。

【实验仪器、材料和试剂】

OLYMPUS-BH 系列显微镜装配的 PM-10AD 摄影装置，135 全色胶卷，标本片或培养细胞。

【方法与步骤】

（一）对被摄样品的要求

（1）选用标准的载玻片和盖玻片。光源入射光束，经载片透射标本，再经盖片进入物镜。处于光路之中的玻璃，应是表面无伤痕，内无气泡、外无霉斑。这样可以杜绝光线乱反射，防止阻光，降低亮度以及有损清晰度。载玻片厚度不宜超出聚光镜的焦距，一般在 1.5mm 以内，可将光源的光束集中于载玻片的标本上。盖玻片的标准厚度为 0.17mm，若使用厚度大于工作距离的盖片，物镜前透镜会触及盖玻片，同时不能准焦；盖玻片厚，球差就大，会降低影像质量。有效盖玻片厚度，包括封固剂的厚度，即树胶或尤派胶用量，因此，封固剂要调稀，少许滴加一薄层。

（2）若拍摄染色体的标本，染色体应处于相宜的时期，平展逸散、完整无损。染色体的计数和组型分析，以有丝分裂的中期（或晚前期）、减数分裂的终变期为宜。这时染色体收缩变短，呈典型形态，易识别。通过前处理的精细加工，染色体相互逸散，互不接触，并尽可能使之平展于同一水平上，又不失细胞的完整轮廓。

（3）染色鲜明适度，标本过染，染料堆积，使样品模糊成一块，难以辨别细节，缺乏质感；样品着色过浅，使影像不鲜明，辨认不清，反差不大；色彩鲜明，胶片易感受，拍摄效果好。

（4）清洁无尘，消除气泡。制片中的灰尘异物和气泡，有损影像的质量，妨碍观察。气泡为临时制片的常见弊病，小的气泡有碍观瞻；大的气泡连片，推挤染色体，堆积集中，损坏了好的影像，要随时滴加所用的临时封固液，消除气泡。

（二）拍摄

拍摄是显微摄影系列操作中的关键环节。在镜检观察中，发现极需摄下的影像，应即时拍照。

拍摄前，先做好一系列的操作准备，例如，摄影物镜和目镜的合理组合、光路合轴、科勒照明，合理加用滤色镜、调准孔径光阑和视野光阑以及应用低速全色胶片等。这些操作彼此相关，缺一不可。然后转入取景、聚焦和曝光拍摄。

1. 取景和聚焦

显微摄影要通过摄影装置的侧视目镜取景器，对准拍摄的物体影像，选取适宜的物像进行拍照。

（1）屈光度调节：取景聚焦前，首先进行屈光度调节，使目镜取景器适于各种不同视力者，达到准确的聚焦。在显微摄影装置的接头部位，有一筒状侧视目镜取景器，它由数片透镜组成。近眼端为屈光度调节环，能左右转动，变换透镜间距，改变焦点距离。调节环旋转调节的最大范围为±5 屈光度（1 屈光度相当于眼镜的 100 度）。经过调节，使近（远）视眼在 500 度以内的人，可脱下眼镜取景调焦。

在侧视目镜取景器内有一玻璃屏，上刻双十字线。调节时，左右转动屈光度调节环，使

侧视目镜取景器镜筒的前端伸缩，改变焦距，至清晰地分辨出双十字线止。通过改变取景器的筒长，以辨清双十字线为依准。使不同视力者，在显微摄影时，都可做到精确的准焦，拍出清晰的底片，绝不会因视力不等，获得不同的拍摄效果。

双十字线校准后，要保持不变，不能随意变动，以防焦距改变。取景聚焦，只需使用显微镜调焦螺旋。屈光度调节，仅改变目镜取景器的长度，不涉及被摄物体至暗箱焦平面的距离。当十字被看成双线时，聚焦的影像焦点，能清晰地投射在焦平面上；如果十字线被看成单线，即使影像是最清楚的准焦，其焦点并不落在暗箱的焦平面上，而位其前后，底片影像模糊不清。当改变拍摄者或左右眼调换使用时，皆需重新进行屈光度调节。

(2) 取景：取景决定拍摄的对象、范围和大小，专用摄影设备，用侧视目镜取景器取景。在刻有双十字线的玻璃屏上，同时刻有数种规格的长方形取景框。底片所摄下的范围，并非视野所见的全部，仅是圆形视野中的长方形部分。在可供系列暗箱共同使用的取景器中，有数种规格的取景框。取景时要准确选用，务使所用暗箱的规格与取景框的大小相符。

拍摄的物体一经确定后，即要考虑拍摄的范围和大小（放大倍数）。例如，拍摄减数分裂的同步性，为展示植物花粉母细胞在花药中同步地进行减数分裂，拍摄的范围应大，在一张底片上，要有足够的数量同步分裂的花粉母细胞，以数量突出同步性。这时选用低倍的物镜和目镜拍摄。作为染色体计数和组型分析的摄影，拍摄的范围要小，每片要拍全一个细胞的染色体，尽可能利用取景框所能提供的范围，提高放大倍数，使染色体与取景框相接。

取景时，要使被摄物体的影像中心位于长方形取景框的对角线中心，并使两者的长、短轴相应。需要 90° 调整时，转动载物台或摄影装置，让影像轴和取景框横轴平行。影像大小用调换物镜和目镜控制。

(3) 聚焦：转动显微镜的粗细调丝螺旋，改变物镜前透镜和被检物体的距离，使视野中物体影像焦点聚于暗箱的焦平面上。纵横移动镜台上的制片标本、寻找拍摄的图像上下移动调焦螺旋，辨清物体的细微结构。取景聚焦，需几经反复。底片影像清晰度决定于拍摄前的最终一次准焦。

取景聚焦完毕，立即按下快门按钮。任何有关操作，都要在聚焦前完成。准焦后的微小颤动，也会引起焦点的改变，致使拍出的底片影像模糊不清。使用 135 胶片拍摄，卷片要在聚焦前完成，尤其使用镜臂升降的显微镜更应注意。加放滤色镜务必在聚焦前置于镜架上。

摄影暗箱的焦平面要与载物台平行，否则调焦后的影像不会垂直地投射到胶片上，致使影像部分清晰，部分模糊。

拍摄有丝分裂中期染色体，要对准两个染色单体间的空隙部分聚焦；具各种分带的染色体，亦可对准带纹准焦。同一细胞内的各染色体，往往不易分散在同一水平上，多少有一个深度或层次。

对此，要聚焦在中层的染色体上，力争物镜和目镜所能给予的有限的焦点深度，以期扩大清晰范围。当然，降低物镜的数值孔径，亦可提高焦点深度。

用 $4\times$ 或更低的物镜拍摄时，由于焦点深度大，影像很大的深度内都保持清晰，致使难以做到准确的聚焦。为此，要把聚焦望远镜装在目镜取景器上，借以聚焦。因为望远镜使物像放大，焦深变小，易使物像准确地聚焦。聚焦时，将望远镜的焦距调至无限远处重新进行

屈光度调节。待看清两条平行十字线后再转入调焦操作。

使用单张散页片暗箱摄影，先把暗箱拉盖抽出，稍待片刻，稳定后聚焦。

2. 曝光

曝光是显微摄影技术上一个重要关键。曝光最重要的问题就是判定曝光时间，确定曝光所用的快门速度、显微摄影的视野，亮度变化极大，曝光时间的变化幅度甚大，正确的估计曝光时间，比普通摄影要困难得多。常用的估计影像亮度来确定曝光时间的方法。往往因光强度的特大变化，人眼对光的强度不会有科学的定量能力，致使发生错误。

曝光过度，使底片密度很大，浑、暗不清，没有透明的地方，丧失影纹细节；在最小密度部分灰雾密度大，底片反差太小。曝光不足，整个底片密度很小，比较透明，虽然最大密度部分影纹分明，但最小密度和灰雾密度一样，没有影纹存在，缺乏正常的反差。这类底片根本不能印放出合格的照片。

影响曝光的因素很多，其中包括被摄物体的颜色和光学性质物镜的数值孔径和倍数、目镜倍数、胶片的性能、滤色镜的颜色、光源强度和色温等因素。下面概述几个主要因素，除胶片感光速度是表示对亮度的敏感强度外，考虑其余因素的共同着眼点，就是分析它们对被摄影像的亮度是加强还是削弱。

(1) 照明光源：光源灯是显微摄影的照明光源，它有数种，照明强度和色温各不相同。低压钨丝白炽灯为常用的照明光源，灯泡很小，便于使用，灯丝聚成球状，颇似点光源，光线易会聚成束，强度较大。所用电压为 6~12V，功率为 5~60W，以 6V、15W 的灯泡最常见。灯丝发出的光磷成分和光量，决定于它的色温。色温越高，发出的光量越大，光谱成分中蓝紫光的比例增多。色温与电压有关，电压升高，光量愈大，色温提高，蓝紫光成分增多。6V、15W 灯泡较之 12V、60W 灯泡，无论在色温和发光量上，都相差较大。显微摄影的曝光时间按所用光源强度而定。电压高，功率大的灯泡，照明强度高，蓝紫光多，使胶片感光快，曝光时间要短。与其他光源相比，钨丝白炽灯的发光，红橙光多，蓝紫光少，所以灯光显黄色。发出的光为连续光谱，加上适当的滤色镜，可得到可见光谱中的任一单色。

卤钨灯为一新型光源灯，发光效率高，照明强度大。灯泡小，石英玻璃外壳，发光灯丝近点状，色温在 3 000K 以上，发光稳定，比功率相同的钨丝白炽灯亮得多。胶片感光快，曝光时间要短，卤钨灯的光谱曲线也是连续光谱。常用 12V、50W 和 12V、100W 两种灯泡。适于显微摄影照明用。

(2) 胶片的感光度：目前常用感光胶片为 ASA100 (21Din) 全色胶卷。胶卷的感光度直接影响曝光时间，ASA 感光标准，其数值相差一倍时，胶片的感光时间也相应地相差一倍。例如，ASA100 的胶片，正确的曝光时间为 1/15s 时，ASA50 的胶片则曝光 1/8s，而 ASA200 的胶片只需曝光 1/30s，依此类推。“Din”制感光标准，每差三个数值，胶片感光时间相差一倍。如 21 Din 胶片，正确的感光时间为 1/15s，24 Din 度胶片只要曝光 1/30s。我国的胶片感光标准“GB”制同于“Din”制标准。使用胶片时要注意：同一感光度、不同牌号的胶卷，其实际感光度不尽相同。即使同一牌号的胶卷，不同时期的产品（乳剂号不同），在性能上会有稍许的差异。胶片超过有效期，或保存条件不佳，胶片的感光度会降低。使用时要酌情增加曝光时间。

(3) 物镜的数值孔径和目镜的放大倍数：曝光时间取决于视野中的影像亮度。影像亮度与物镜、目镜的性能相关。物镜的数值孔径大，进光量多，影像亮度大，曝光时间要短，目镜放大倍数大，视野相对加大，影像的亮度相应的减小，曝光时间要长。总之，曝光时间与物镜的有效数值孔径的平方成反比、与目镜的放大倍数的平方成正比。

此外，目镜至暗箱焦平面的距离，也就是接筒和暗箱的长度是影响曝光时间的因素。距离越长，光线越弱，其强度与距离平方成反比。所以，曝光时间与目镜至胶片的距离的平方成正比。长度愈长，曝光时间愈多。

(4) 滤色镜的颜色：滤色镜具有滤光的作用，光源投射的光束，经滤色镜的选择吸收，仅有部分色光透射。减弱了光源的照明强度，其减弱的强度因滤色镜不同而有别。被滤色镜减弱的光强度，在摄影时必须给予补偿，以达正确的曝光。一般用滤色镜的因数表示，所谓因数就是用某种滤色镜后，应在曝光时间上增加的倍数或曝光补偿倍数。但是补偿的倍数不是固定不变的，可随条件不同而改变。例如，使用全色胶片拍摄，因对全部可见光的各种光都感受，加用黄滤色镜仅吸收蓝光，红光和绿光都可透过，所以因数小，即补偿倍数小。加用红滤色镜，吸收了绿光和蓝光，仅透过红光，滤色镜的因数大即曝光补偿倍数大。蓝色滤色镜，颜色深，吸收色光多，因数大。光源的色温不同，滤色镜的因数也不同。光源色温高，照明光线中蓝紫光多，加用黄滤色镜，吸收的色光多，因数大；光源色温低时照明光线中红橙光多，蓝紫光少，黄滤色镜吸收的色光相对减少，所以因数小。

一般情况下，使用全色胶片时，黄滤色镜的因数小，蓝、绿和红滤色镜的因数大。适宜的曝光补偿倍数，要通过试拍解决。中黄滤色镜的补偿倍数为 1~1.5 左右，中绿滤色镜为 2 左右。

(5) 被摄物体的染色和光学性质：视野中影像的染色和反射光情况，也是影响曝光的因素。标本染色适度，分色好，清晰醒目，背景透明，反差大，曝光的宽容度大，容易拍出感光适宜的好底片。染色过深，分色不好，被摄体被染料堆积，微细部分辨不清，底色大，背景昏暗，通透性不好，曝光时间要长。染色浅淡，物体不鲜明，与背景区别不大，反差小，曝光时间要短。后两类材料难以拍出好的底片，除非是奇缺，否则，应放弃之，不值一拍。被拍物体染成蓝紫色，较之其他颜色，容易拍出好的底片。红、黄和绿，因胶片对其敏感性较差，难以拍出理想的底片。

从上述诸因素中，决定出准确曝光的快门速度。调准速度后边取景聚焦，边持快门线，待准焦后，立即按动快门按钮，快门开启，胶片感光。曝光时严防振动，按动快门，不要用力过猛。低速曝光的轻微颤动，也会使底片上的影像模糊不清。

目前，从摄影设备的设计制造上，已能完全保证准确曝光。如在光电元件控制下的自动曝光或用曝光表测定后的曝光，都可拍出感光准确的底片。但是，由于设备的限制，尚不能普遍采用，还有相当部分是手工操作的摄影装置。即使在完全手控条件下，只要多拍，精心钻研，长期地记录对比，达到正确的曝光是不难的。因此，严格控制光源的电压，使照明强度保持相对稳定状态，在一定的物镜、目镜组合下，调节使用与之相应的光阑开度，科学地运用滤色镜。保持使用同一种胶片，并能熟练地掌握显影技术，就一定能拍出理想的底片。

感光胶片摄影曝光后，即转入暗室工作，经显影、停显、定影和水洗后形成底片，晾干后用相纸印成照片。

上面谈到的是手控操作的常规拍摄程序和方法。现在，显微镜和摄影装置日臻先进完善，自动化程度越来越高，只要掌握操作规程，获得一张理想的底片还是不难的。但是，由于装置的自动化器件复杂多样，真正做到得心应手的操作，还是需要花费些时间和气力的。自动化装置只是提供了一个成功的可能性，自动化程度越高，装置越复杂，越需要熟练各个部件的性能及其操作方法，绝不可认为自动摄影装置，只需打开开关，按下电钮就行了。

下面以 OLYMPUS-BH 系列显微镜装配的 PM-10AD 摄影装置为例，概要介绍拍摄的程序与方法。

PM-10AD 装有一自动曝光调控装置 (automatic exposure control unit)，它是整个系统的核心，该机装有小型电子计算机进行调控，能自动地进行必要的信息处理。摄影者需要做的只是通过仪表板上的度盘和开关将有关胶片尺寸、感光度和倒易律失效特性、被摄标本特性 (视野背景的明暗、标本的密度等) 的数据输入进去，让电子计算机计算、修正，以达最佳曝光。

(三) PM-10AD 拍摄的准备工作的准备工作

1. 检验摄影装置

在胶卷装入暗箱之前，应熟练掌握摄影装置每个部件的结构与性能。检验其组装情况是否完好无误，并按要求进行正确的操作。其步骤如下：

(1) 把自动曝光装置机体 (automatic exposure body) 上的光路选择器拉杆，向外拉出一级，露出拉杆上的绿色环带。在选择器的位置上刻有绿色的“CVE”字母，表示此级可作为观察取景聚焦和曝光之用。此时的光路中有 64% 的光线进入胶片面，16% 光线进入聚焦取景器，还有 20% 进入曝光调节器 (测光表)。

(2) 将自动曝光调控装置上的曝光方式选择器刻度盘 (MODE/EXPOSURE TIME) 的旋钮对准“AUTO”位，此位为自动曝光档 (automatic exposure)。该刻度盘上尚有“FLASH”位，为闪光同步器 (flash synchronizer) 用。还有“MANUAL”位，为手控曝光用，曝光时间范围 1s~40min，各刻在定时器上。

(3) 将 ASA 胶片感光度刻度盘 (ASA film speed dial) 的旋钮调至所用胶片的实际感光度值 (ASA)。目前市面出售的多为感光度 ASA100 (GB21°) 的胶片。

(4) 当打开位于自动曝光调控装置右侧的 ON-OFF 电源开关时，该装置正面左下角的安全灯 (SAFETY) 点亮。该灯指示曝光时间是否在自动曝光范围的限度以内，用不同的色光显示。

①绿色可以进行正确的曝光。

②红色并伴有蜂鸣的警告声响：持续的响声说明照明光源照度不足；间歇的响声说明光源照度过高。

纠正后两种情况的方法：滑动位于显微镜镜座上右侧的调压钮使照明强度升高或减弱。

(5) 按压绿色的标有“EXPOSE”字样的快门释放按钮，照相机暗箱的快门开启，同时

在自动曝光控制装置上的工作 (WORK) 灯点亮, 两者同步。

(6) 暗箱上的快门闭合, WORK 灯同时熄灭。随之胶片自动卷过 (前进) 一帧, 进片时, 暗箱前面的卷片指示灯 (WINDING) 点亮, 伴有微弱的马达 (motor) 驱动声。

2. 把 35mm 胶卷装入暗箱

(1) 提起暗箱上的后盖开启/倒片旋钮 (BACK COVER RELEASE/ REWINDER KNOB), 随“咔哒”一声响, 暗箱的后盖开启。

(2) 把装入暗盒内的 135 胶卷放入暗箱的胶卷室中, 把后盖开启/倒片钮推回原位并将胶卷卡住。

(3) 将胶卷外露的一端, 拉向相对的一侧, 把胶片头插入卷片轴杆的裂隙中。注意, 不要把胶片头从裂隙的另一侧伸出。

(4) 按下自动曝光控制装置的时间停止/进片“TIME OFF/WINDING”按钮, 使胶片向前卷动, 至片孔与轮齿啮合。

(5) 关闭暗箱后盖, 紧压, 直到听到“咔哒”声止, 此时后盖已严合。

(6) 再按 TIME OFF/WINDING 钮, 每按动一次胶卷前进一帧, 压下 2~3 次后, 至暗箱上的曝光计数器现出“1”时止。

(7) 作为使用中的胶片的提示物, 可将 35mm 胶片包装纸盒端部的小型方纸卡, 插入暗箱后盖的便笺夹框中, 以示所用胶片的种类、牌号、规格和感光度等。

3. 胶片拍摄完之后

(1) 一个全卷胶片拍完, 卷片马达停止工作, 控制装置上的胶片结束“FILM END”灯亮, 并伴有警告声。待卸下胶卷或拿掉暗箱以及压下“TIME OFF”按钮时, 灯灭声息。

(2) 反时针方向把暗箱上的倒片释放离合器钮转动 90°, 使卷片的齿轮可以倒转。

(3) 搬开倒片手柄, 按顺时针方向连续绕动, 当胶片正在倒转时, 可感到拉力, 当拉力骤然消失时, 预示胶片头已脱离卷片轴杆, 摄完的胶卷已全部进入暗盒, 外剩的只是装胶卷时外露的片头。切记: 片头绝不要全部倒入暗盒, 以免光线由暗盒的进出片的缝隙进入!

待胶片完全倒转后, 倒片释放离合器自动复位。

(四) PM-10AD 装置的摄影操作

1. 35mm 黑白胶片的显微摄影技术步骤

(1) 把“MODM/EXPOSURE TIME”曝光方式选择器的旋钮对准“AUTO”位, 以进行自动曝光。

(2) 在标有“FORMAT”字样的规格选择器开关的三个按钮中, 压下最上面的注明“35”的按键。

(3) 把 ASA 标度盘的旋钮, 对准所用胶卷的感光度值位上。

(4) 按所用胶卷的种类和特性, 校准倒易律失效补偿。“RECIPROCITY”标度盘。在自动曝光控制装置的底层, 备有滑动的塑料板上印有不同类型胶片的校正值, 可供查用。一般情况下, 将旋钮调到“4”位即可。

(5) 把回转式目镜取景器的屏幕选择杆, 调到“35”位。此时, 35mm 的长方形画幅框

线（由非连续的四角形刻线构成）处于连续的长方形框线之中。

(6) 转动回转式目镜前端的屈光度调节环，同时观察屏蔽上的“十”字形线，转至能清晰的分辨为两条平行的双十字线时止。

(7) 通过目镜取景器对被摄样品聚焦，寻找理想的拍摄物像。正确的选用物镜和目镜。使放大的被摄样品的物像触及框线，以充分利用 35mm 框线所允许的放大范围。

(8) 调节曝光调节刻度盘“EXPOSURE ADJ”进行标本的曝光补偿。样品的明暗和在视野中的分布状态，以及视野背景的亮度，都会给自动曝光造成影响，形成不准确的曝光。

根据标本和背景情况，通过刻度盘的调节，使曝光得以补偿，达到准确的曝光。其具体调节原则见表 1-2。

表 1-2 曝光补偿调节选择

物体状态	曝光补偿刻度位置	相当 ASA 的感光度	曝光变化
明视野中稀疏的分布着暗物体	0.25	25	超过 2 级
明视野中分散着暗物体	0.5	50	超过 1 级
整个视野中均匀地分布着物体	1	100	标准
明视野中分散着暗物体	2	200	低于 1 级
明视野中稀疏的分布着暗物体	4	400	低于 2 级

(9) 在进行曝光前，要注意 SAFETY 灯的颜色，情况正常时，灯亮为绿色，此时可以曝光；反常情况下（照度过或不足），灯亮为红色，此时不能进行曝光，要设法恢复正常时才可曝光。

(10) 在显微镜座的滤色镜架上，根据需要加用各种不同的滤色镜（filter）。

(11) 按下快门释放按钮“EXPOSE”，快门开启，胶片感光；曝光同时，工作信号灯“WORK”亮；快门闭合，曝光结束，灯熄灭，胶卷自动进片一帧。

(12) 整个胶卷拍摄完了时，胶片结束信号灯“FILM END”亮。

(13) 按操作规程卸下胶卷，待冲洗。

2. 35mm 彩色胶片的显微摄影技术步骤

彩色胶片的显微摄影技术，基本上与黑白胶片的程序类同，只要在暗箱中装上彩色胶片，并在光路上加以适当的滤色镜，并进行色温的调节就可以了。

何谓色温呢？在物理学上，铁、钨等标准黑体（black body）以其绝对零度（-273℃）为起始点，当加热到一定温度时，就能呈现出有颜色的可见光，光的颜色将随温度的升高而变化，这种温度就叫做该光源的色温。

黑体是指在辐射作用下，既不反射也不透射，而能把落在它上面的辐射全部吸收的物体。黑体被加热，其表面辐射的光谱功率的大小及分布，完全决定于它的温度。当黑体被连续加热，温度不断升高时，所发出的光有一定的颜色，其变化顺序是红—黄—白—蓝。

当光源所发射的光的颜色与黑体在某一温度下辐射光的颜色相同时，黑体的这个温度称为该光源的颜色温度，简称色温，用绝对温度表示，单位为 K（Kelvin）。

同一灯光的色温，受电压的高低变化而改变。电压高时色温增高，电压低时色温降低。所以，在显微摄影时要注意这一点。

摄影上所谓的色温高低，只是意味着光源中所有红、蓝色光的不同比率，而与实际温度无关，如果在一盏色温为 3200K 的钨丝灯上，包被一层黄色透明纸，其色温会立即下降；包上一层淡蓝色的透明纸，其色温就立即上升。同理，在严寒或酷暑的气候下，色温的变化并不随气温的升降而变化。

用 PM-10AD 摄影装置进行彩色摄影的程序和方法如下：

- 调节光源色温

(1) 安装 PM-CTR 色温微型组件：

1) 卸下自动曝光装置机件左手侧的盖子。

2) 将测定照明光源色温用的色温微型组件（测定色温专用）组装在自动曝光装置机体的左侧。用组件固定螺丝连接，并用硬币牢固的拧紧。

(2) 校准色温：

1) 将载玻片上的被摄样品部分放在物镜下聚焦，然后移开样品，把载玻片的空白部分（注意，只能是空白部分！）移入光路，以便测定光源的色温。

2) 把自动曝光装置机体上的光路选择调节器杆全部拉出，露出杆上的黄色环带。在孔的上缘标有黄色的“VCT”字样，表示观察和色温之意。在此位置上照明光源的 80% 的光线进入目镜取景器，20% 光线进入色温测量装置。

3) 依所用彩色胶片的类型，将色温微型组件左侧转轮上的 D 或 T 标志，对准正面长方形字盘中间的三角形标志。用日光型彩色胶片时，把“D”对准三角形；使用灯光型彩色胶片时把“T”对准三角型标志。

4) 在显微镜座的滤色镜架 L，加放色温转换滤色镜。使用日光型彩色胶片时，加用 45LBD2 滤色镜；使用灯光型彩色胶片时，加用 45LBT 滤色镜。

5) 接通电源，进行色温的调节。主要是通过位于显微镜座右手侧的滑动电压控制杆（sliding voltage control lever）的前后滑动，使照明光源的电压升降，改变照明光源的色光成分，与色温转换滤色镜一起作用，从而使色温提高或降低。并通过观察垂直成行的色温测定器字盘上指示灯的变化，以确定所需要的色温。

在色温测定器示度盘的左侧，中间有一个三角形标志，上方为 4 个绿色正方形窗；下方有 4 个红色正方形窗。接通电源后，其中某一标志窗亮。如果绿色正方形亮，表明色温偏高，光源中蓝光偏多，偏高的程度，视所亮的绿色正方形位置而定，愈位于上方，色温愈高。如果红色正方形亮，示色温低，光源中红光偏多，其偏多的程度，视所亮的红色正方形位置而定，正方形位置愈低，色温愈低，色光中红色愈多。只有中央的黄色三角形窗亮时，色温才恰到好处。此时的光源照明光线的色温与彩色胶片所需要的色温平衡。

色温测定器上标志灯的点亮，通过照明光源的电压的升降控制。

在此，特别强调一个注意点：一旦色温校准，光源的电压、滤色镜系统，丝毫不准改变。否则色温将会改变，失去平衡。

6) 将光路选择调节器杆推进一级，使绿色环带（CVE）位于孔口处。

7) 将载玻片上的样品位，移入光路。

如果光源照明过亮。需要降低照明时千万不要通过降电压的方式，以防色温降低。要用加放中灰滤色镜的方法，降低照明光量。因为灰滤色镜是一种不改变色温，仅减少照明亮度的滤色镜片。

以后，按正常程序进行拍摄，其方法基本同于黑白胶片的显微镜摄影。

彩色胶片的冲洗，要求严格，不同类型不同厂家的产品冲洗配方各异。因条件限制，暂不能自行冲洗时，可请冲洗单位加工。

(五) 自动曝光控制装置的特殊应用

1. 手控曝光

在某些条件下，应用手控曝光更为适宜时，使用手动曝光方式。

在曝光方式选择器示度盘 (MODE/EXPOSURE TIME) 有三种方式：自动曝光 (AUTO)、闪光同步曝光 (FLASH) 和手控曝光 (MANUAL)。

在手控曝光方式的时间刻度盘上，右侧为秒 (SEC)，左侧为分 (MIN)。曝光的时间范围为 1s~40min，在此范围内，可任选某一曝光时间，只要把旋钮对准即可按下快门释放按钮 (EXPOSE)，快门仍然是自动开启、闭合，只是曝光的时间为您所定。如果曝光时间需要超过 40min，进行长时间曝光时，把旋钮对“T” (time) 位，当按下快门释放按钮时，快门保持持续的开启状态，直到压下自动曝光调控装置上的时间中止/胶片前进按钮 (TIME OFF/WINDING) 时，快门开始闭合。

2. 自动曝光固锁按钮 (AE LOCK) 的使用

当被摄样品很大，或使用高倍率放大摄影时，一个完整的标本，需分区段进行连续的几次拍摄，然后在印、放照片时接连一起。这样，就需使同一物体不同构图的各帧底片，要有严格相等的曝光量。“AE LOCK” (自动曝光锁) 就是为满足上述作用而设置的。在样品的典型区选择以后，按压下“AE LOCK” 钮，从而使曝光时间 (包括以后的曝光时间) 固定，使每一部分 (帧) 的曝光都相同，直到再次压下“AE LOCK” 钮为止。当“AE LOCK” 钮被压下，在起作用的时间内，该钮上方的指示灯闪亮。

3. 35mm 胶片的多重曝光

自动曝光调控装置装有 35mm 自动卷片装置，每次曝光后，自动地卷绕底片前进一帧。按下述方式可达一帧画面 (一张底片) 多次曝光的目的。

(1) 把胶片尺寸选择开关 (FORMAT) 的中部标有“L”的按钮压下 (从而使自动卷片功能丧失)。

(2) 将 ASA 胶片感光度刻度盘旋钮调到所用胶片实际感光度的 8 倍 (即把 ASA100 的胶片感光度值，调至 ASA800) 位上。把感光速率调到高值，可防止多重曝光所易产生的过度曝光的结果。多重曝光完了后，要压下“35” 胶片尺寸按钮，并压下胶片前进按钮 (WINDING)，使多重曝光的这帧底片卷过。

实验 4 光学显微标本的制作技术

【实验目的】

了解光学显微镜切片制作技术的基本方法步骤。

【实验原理】

采用光学显微镜研究一般生物体的内部结构，在自然状态下是无法观察清楚的，多数动、植物材料都必须经过某种处理，将组织分离成单个细胞或薄片，光线才能通过细胞。为了适应这个需要，就产生了光学显微镜制片技术。

光学显微镜的制片技术方法可分为两大类：一类是非切片法，另一类是切片法。

非切片法，是用物理或化学的方法，使细胞彼此分离，如有分离法、涂布法、压碎法等。非切片法的操作比较简单，能保持细胞的完整，但是细胞之间的正常位置往往被更动，无法反映细胞之间的正常联系。它可以与切片法配合使用，各取其长处。

切片法，是利用锐利的刀具将组织切成极薄的片层，材料须经过一系列特殊的处理，如固定、脱水、包埋、切片、染色等，过程十分繁复。在制作过程中，还要经过一系列的物理和化学的处理，这些处理方法可根据各种不同材料的性质要求进行合理选择。切片法虽然工序繁琐，技术复杂，但是，它最能保持细胞间的正常的相互关系，能较好和较长时间地保留细胞的原貌，所以仍然是光学显微镜的主要制片方法。

【实验仪器、材料和试剂】

(1) 仪器、用具：石蜡切片机、恒温蜡箱、载玻片、盖玻片。

(2) 材料：洋葱根或小鼠肝。

(3) 试剂：乙醚、无水乙醇、甲醛、冰醋酸、苦味酸、重铬酸钾、锇酸、正丁醇、二甲苯、石蜡、甘油、鸡蛋、纱布、加拿大树胶、麝香草酚。

【方法与步骤】

光学显微镜切片制作技术最简单的切片法是徒手切片，但是由于组织块往往十分柔软，切削很困难，而且无法得到十分薄的切片，因此必须先用某些特殊物质渗入组织块的内部起支持作用，并将整个组织块包住，然后再用精密的切片机制作切片，才能获得良好的效果。这种方法称为包埋法，包埋的物质称为包埋剂。常用的包埋剂有石蜡、火棉胶、炭蜡、明胶等，水和塑料也可作为包埋剂。根据包埋剂的不同，分别有石蜡切片、火棉胶切片、冰冻切片等，它们各有长处，可以根据需要选用，但是使用得最多的还是石蜡切片技术。

石蜡作为包埋剂，有其独特的优点，例如：石蜡能切出极薄的蜡片（ $2\sim 10\mu\text{m}$ ）；切片时能连成蜡带，便于制作连续切片；操作较容易，组织块可以包埋在石蜡中长期保存。然而石蜡切片的制作过程较长，步骤很多，一步不慎往往导致前功尽弃，而且这些处理引起组织块或多或少地收缩，切片时受湿度影响比较大，这些不足之处必须在制片过程中认真对待，尽

量减小它的不良影响。

石蜡切片的制作过程主要包括：取材、固定、脱水、透明、透蜡、包埋、切片、贴片、染色、透明、封藏等步骤。

1. 取材

材料的好坏直接影响到切片的质量，无论取哪一种动植物材料，以下几点是必须注意的。

(1) 植物材料选择时需尽可能不损伤植物体或所需要的部分；动物材料取用时常对动物施以麻醉，常用的麻醉剂有氯仿和乙醚，或将动物杀死后迅速取出所需要的组织。

(2) 取材必须新鲜，这一点对于从事细胞生物学研究尤为重要，应该尽可能割取生活着的组织块，并随即投入固定液。

(3) 切取材料时刀要锐利，避免因挤压细胞使其受到损伤。

(4) 切取的材料应该小而薄，便于固定剂迅速渗入内部。一般厚度不超过 2mm，大小不超过 5mm×5mm。

2. 固定

组织和细胞离开机体后，在一定时间内仍然延续着生命活动，会引起病理变化直至归于死亡。为了使标本能反映它生前的正常状态，必须尽早地用某些化学药品迅速地杀死组织和细胞，阻抑上述变化，并将结构成分转化为不溶性物质，防止某些结构的溶化和消失。这种处理就是固定。除了上述作用外，固定剂会使组织适当硬化以便于随后的处理，还会改变细胞内部的折射系数并使某些部分易于染色。

固定剂的作用对象主要是蛋白质，至于其他成分如脂肪和糖，在一般制作时不加考虑，如要观察这些物质，可用特殊的方法将其固定下来。

固定剂的作用表现在对材料体积的改变、硬化的程度、穿透的速度以及对染色的影响等方面。这些作用的好坏、大小，都依所固定的材料性质而定，同样一种固定液对某一材料来说是良好的，但对另外一些组织可能就不很适用。良好的固定剂必须具备的特征是：穿透组织的速度快，能将细胞中的内含物凝固成不溶解物质，不使组织膨胀或收缩以保持原形，硬化组织的程度适中，增加细胞内含物的折光度，增加媒染和染色能力，具有保存剂作用。固定剂有简单固定剂和混合固定剂的划分。

简单固定剂即单一的固定剂，常用的有乙醇、甲醛、冰醋酸、升汞、苦味酸、铬酸、重铬酸钾和钒酸。其中，苦味酸、升汞、铬酸既能凝固细胞清蛋白，又能凝固核蛋白；乙醇只能凝固清蛋白，而醋酸只能凝固核蛋白；甲醛、钒酸和重铬酸钾对这两种蛋白质都不凝固。

简单固定剂的局限性较大，如将其适当混合，制成复合固定剂可以取得更好的效果。常用的混合固定剂有：

Bouin 液（70 份苦味酸饱和水溶液+25 份 4% 甲醛+5 份冰醋酸）、Zenker 液（升汞 5g+重铬酸钾 2.5g+硫酸钠 1.0g+5ml 冰醋酸+100ml 蒸馏水）、Carnoy 改良液（3 份无水乙醇+1 份冰醋酸）等。固定剂的种类甚多，我们必须依据各种固定剂的性能及制片的不同要求来加以选择。

固定时，须注意以下几点：

(1) 固定剂应有足够的量，一般为组织块体积的 10~15 倍。