

## 實驗一 顯微鏡的使用和測量

1673年，李文霍克藉由兩塊金屬片包著兩面凸透鏡粗製的顯微鏡，介紹這世界上存在著的微生物形態的生命。多年之後，顯微鏡從簡單的李文霍克的單透鏡顯微鏡可放大物體300倍，發展到今天的電子顯微鏡有能力放大標本至250,000倍。顯微鏡有光學顯微鏡和電子顯微鏡兩種，最普遍的是使用可見光或紫外光來顯示標本。光學顯微鏡包含光，暗，對比和螢光顯微鏡的種類。光學顯微鏡包含兩個透鏡系統來放大標本，分別是目鏡和物鏡，標本是透過鎢絲燈聚焦在一個叫聚光器的波束來顯示，而標本則出現在較暗的顯像和亮的背景。螢光顯微鏡則是用比可見光較短波長並不傷害人們的眼睛的紫外光幫助觀察，電子顯微鏡則用電子波束代替光線、磁性體代替透鏡來觀察超微的粒子。

### 實驗目的

瞭解顯微鏡使用的正確方法。

學習正確使用顯微鏡來觀察及測量各種細胞大小。

### 實驗原理

#### 顯微鏡的各部名稱及功能

本學期會使用到的顯微鏡有雙目鏡複式光學顯微鏡及雙目鏡解剖顯微鏡兩種。

#### A 雙目鏡複式光學顯微鏡 (Binocular compound microscope)

##### (圖1)

1. 接目鏡：放大倍率為 $10\times$ ，兩個目鏡間的距離可因應各人的雙眼寬度來調整。有的目鏡內安裝有目鏡測微尺或指針。接目鏡上有焦距調節輪，可因應各人焦距來調整最佳呈像。

2. 鏡筒：介於接目鏡與接物鏡之間。
3. 旋轉盤：接於鏡筒下方，通常有四個接孔，可接不同倍數的接物鏡，本身可以旋轉藉以更換不同倍數的接物鏡。
4. 接物鏡：一般有 scanning power objective (4×)、low power objective (10×)、high power objective (40×)、oil immersion objective (100×) 四種倍率。
5. 載物台：為放置標本玻片的平台，中央有一圓孔，可供光線通過。我們所使用的載物台為機械式載物台，上面有玻片夾及調節鈕 (mechanical stage control knobs)，可固定玻片及調整玻片位置。
6. 集光器 (Condenser)：位於載物台下方中央，由許多透鏡組合而成，用以集合光線，增加標本的明暗對比。
7. 光圈(虹膜) (Iris diaphragm)：連接於集光器下方，上有一支調整柄 (aperture diaphragm control)，可用以調整光圈孔徑大小，以調整投射於標本上之光線強弱。
8. 照明器 (Illuminator)：位於鏡座上，內設光源為鎢絲燈，直接提供觀察所需之光源。
9. 鏡臂 (Arm)：連接鏡筒及鏡座，並供握取顯微鏡。
10. 調節輪 (Adjustment knob)：位於鏡柱兩側，可調整載物台的升降，以供對焦。
11. 鏡座 (Base)：顯微鏡之最底部。其右側有光源調整鈕，可調整照明器內光源亮度；後方接有電源線，有的廠牌尚有光源開關。

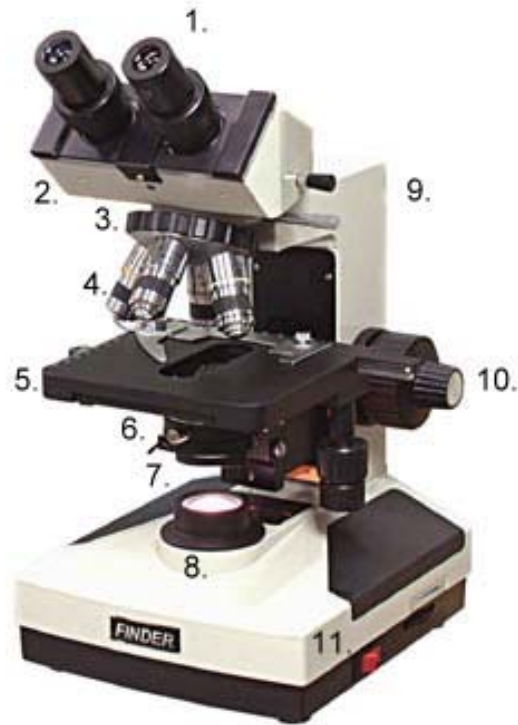


圖 1. 複式光學顯微鏡

## B 雙目鏡解剖顯微鏡 (Binocular dissecting microscope)

(圖 2)

1. 接目鏡( Eyepiece )：兩個接目鏡可因應各人眼寬來調整距離。
2. 鏡筒 ( Body tube )：介於接目鏡與接物鏡之間。
3. 接物鏡( Objective )：0.7~4.5X 無段式變焦。
4. 調節輪( focusing knob )：位於鏡柱兩側，可調整接物鏡的升降，以供對焦。依順時鐘方向（遠離自己身體方向）旋轉，則接物鏡上升，反之則下降。
5. 鏡柱( Pillar )：連接鏡筒及鏡座，並供握取顯微鏡。
6. 照明器 ( Illuminator )：上光源位於鏡柱前方；下光源位

7. 鏡座 ( Base )：顯微鏡之最底部。其上有載物台，旁邊有電源開關。



圖 2. 解剖顯微鏡

## 複式光學顯微鏡的使用與保養

### A 顯微鏡的取用

1. 提取顯微鏡時，務必一手緊握鏡臂，一手托住鏡座並緊貼身體。若長距離移動時，更應將鏡筒朝內，以免目鏡不慎掉落。
2. 將顯微鏡輕輕放置在桌上，距桌緣約一個姆指距離之處。桌上除必要之講義文具，其餘東西皆收進抽屜。
3. 調整坐椅至適當高度，使自己可以輕鬆地使用顯微鏡。

## B 低倍鏡的使用

1. 先將載物台降至最低點，轉動旋轉盤使低倍鏡位於鏡筒正下方。
2. 打開光源，調整光源調整鈕及光圈，使視野中之亮度適當。
3. 將所要觀察的玻片放在載物台上，以玻片夾夾好，並轉動調節鈕以調整玻片位置。轉動粗調節輪，至低倍鏡與載物台相距約 0.1 cm（或載物台無法再上升）為止。
4. 由接目鏡觀察，同時以靠向自己的方向緩緩轉動粗調節輪，使載物台下降，配合細調節輪微調，直到影像清晰為止。若視野太亮或太暗，可調整光源調整鈕及光圈，使視野中之亮度適當。

## C 高倍鏡的使用

1. 先使用低倍鏡找到欲觀察的目標，將該部位調整至視野中央。
2. 將高倍鏡移至標本上方，緩慢旋轉細調節輪及標本調節鈕，直至取得標的物清晰影像。

## D 油鏡的使用

1. 先使用高倍鏡找到欲觀察的目標，將該部位調整至視野中央。
2. 將高倍鏡轉開，加一小滴油鏡專用油（immersion oil）於所見物像範圍的蓋玻片上（即光線照亮的區域），換用 100 倍接物鏡，小心將油鏡浸於油中，重新調整光圈，並緩慢轉動細調節輪，直到影像清晰為止。
3. 使用完畢後，先以拭鏡紙單向擦拭油鏡鏡頭，然後以拭鏡紙沾取酒精或二甲苯擦拭，最後再以拭鏡紙擦拭一遍。鏡頭上切勿殘留油鏡油或藥劑，以免損害鏡頭

## E 注意事項

1. 嚴忌單手提取顯微鏡。
2. 若須在桌上移動顯微鏡，務必將顯微鏡提起再放至適當位置，嚴忌推動顯微鏡（推動時造成的震動可能會導致顯微鏡內部零件的鬆動，切記!!），使用顯微鏡請務必小心輕放。
3. 使用顯微鏡時坐椅的高度應適當，觀察時更應習慣兩眼同時觀察，且光圈及光源亮度皆應適當，否則長時間觀察時極易感覺疲勞。
4. 接目鏡與鏡筒的承接鈕切勿任意旋開，以免提取時目鏡掉落。
5. 標本染色或其他任何操作皆應將玻片取下，操作完成後再放回載物台觀察，切勿在載物台上操作，以免染劑或其他液體流入顯微鏡內部或傷及鏡頭。
6. 觀察完一種材料，欲更換另一種材料時，務必將載物台下降至最低點，換好玻片後再依標準程序重新對焦，切勿直接抽換標本，以免刮傷鏡頭或玻片標本。
7. 欲觀察的玻片上，不應殘留任何水滴或藥劑，以免污染鏡頭。
8. 擦拭顯微鏡鏡頭時只能用拭鏡紙（ Lens paper ），切勿用其他紙張或手指接觸鏡頭。擦拭時應沿單一直線方向輕拭，不可旋轉磨擦。
9. 用畢顯微鏡應將載物台下降至最低點，並將低倍鏡對準載物台中央圓孔處，將電源線捲好，蓋上防塵罩，按號碼放入台車或存放櫃中。
10. 若長期不使用，應以 95% 酒精清潔所有鏡頭。

## 顯微測量

目鏡測微器和載物台測微器可輔助顯微鏡精確測量細胞的大小，有的顯微鏡可以卸下目鏡，以便在目鏡筒中的兩片透鏡間裝上測微器；最

常見的則是裝載在目鏡內，可以直接使用。在使用目鏡測微器之前必需與載物台測微器校準。內置於目鏡的目鏡測微器，是一有刻度刻劃於表面的玻璃圓盤（圖 3），刻度間距離會因使用的物鏡倍數大小而有所不同，測定目鏡測微器區域的大小距離則是用載物台測微器來決定。載物台測微器是一片特殊的載玻片，上面刻有每 0.01mm(10 $\mu$ m) 分隔刻度（圖 4）。

校準目鏡測微器刻度距離時，我們必需把載物台測微器刻度與目鏡測微器刻度重疊在一起（圖 5），校準出目鏡測微器的值。測量程序是：在不同的倍率下分別把目鏡測微器測和載物台測微器的刻度重疊在一起，由已知載物台測微器的距離除以目鏡測微器的刻度格數，即可算出目鏡測微器每格的長度。當校準完成，爾後觀察細胞時，即可直接由目鏡測微器的刻度算出細胞的大小（圖 6）。

例如：

如果 30 個目鏡區域刻度重疊於載物台測微器的 7 個區域

（ $7 \times 0.01\text{mm} = 0.07$ ），所以目鏡測微器的一個區域距離 =  $0.07 / 30 = 0.0023\text{mm}$  或  $2.3\mu\text{m}$ 。

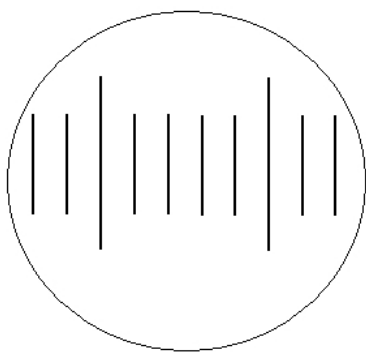


圖 3：目鏡測微器

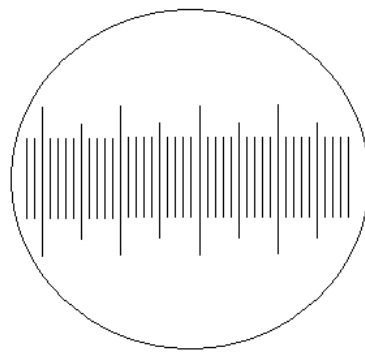


圖 4：載物台測微器

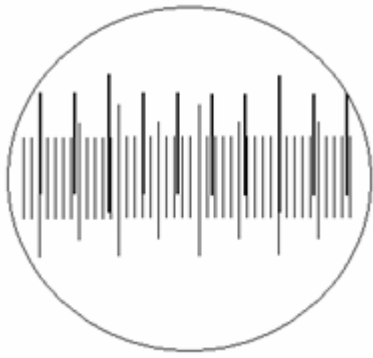


圖 5：測微器校準

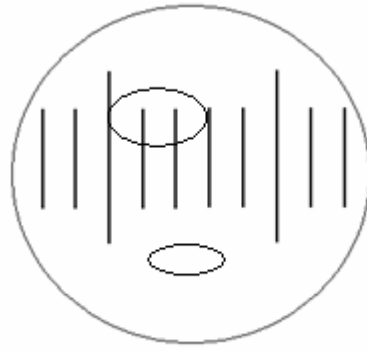


圖 6：目鏡測微器測量

### 把目鏡測微器與載物台測微器重疊

一個目鏡測微器區域以 mm 計算 = 已知兩條線在載物台測微器間的距離 / 目鏡測微計的數目

載物台測微器：刻度是 0.01mm (10 μm) 一格

若視野內有 2 條以上的刻度重疊，則取重疊距離最長的刻度值

### 測定刻度的步驟

1. 小心把目鏡測微器置換顯微鏡上本來的目鏡。
2. 把載物台測微器放在鏡台並置於中間蓋著透光孔。
3. 先以低倍鏡及粗調節輪把鏡台測微器的刻度取得焦點。
4. 轉動目鏡測微器以讓它的刻度可以與鏡台測微器平行。
5. 移動鏡台以讓載物台測微器的線與目鏡測微器重疊，然後看另一條重疊在目鏡測微器與鏡台測微器的線。載物台測微器分隔的數目與目鏡測微器數重疊的地方，我們可以得到這部分區域的值。測定出載物台測微器（區域數目 X 0.01mm）和目鏡測計區域相當的距離。各倍率重複上述步驟，計算出各倍率的刻度值。
6. 從鏡台移除載物台測微器。
7. 觀察頭髮或口腔細胞等樣本，測定其直徑。



## 實驗材料

載玻片，動植物細胞的玻片標本

目鏡測微器，載物台測微器，顯微鏡

## 實驗步驟

熟悉顯微鏡之各部份構造及使用方法，再依下列步驟，繼續觀察。

1. 英文字母“e”方位變化的觀察：

(1) 將字母“e”放在載玻片上，以低倍觀察之。比較其位置與平常所見之不同。

(2) 轉換高倍鏡觀察，並移動載玻片看看視野下之變化。

2. 觀察三條不同顏色的線相交於一點的情形：

在載玻片上放置紅、白、黑三種不同色的線，共同相交於一點，於低倍鏡下轉動調節輪觀察。找出三者各居上中下何種位置。

3. 顯微測量：

(1) 將刻有精確微細刻度的載物台測微器置於載物台上，量出目鏡測微器每一刻度在40X, 100X, 400X之下，相當於多少 $\mu\text{m}$ ？

(2) 將載物台測微器移去，分別改放頭髮、口腔黏膜細胞、蛙血球細胞等玻片標本，並利用目鏡測微器量出它們的大小。

## 問題

1. 接物鏡鏡筒長短與倍數有何關係？

2. 物體在顯微鏡下成像的方位有何變化？

3. 觀察三種絲線相交於一點，目的何在？

4. 從低倍鏡轉到高倍鏡，視野變化如何？

5. 頭髮或口腔黏膜細胞之直徑各為若干 $\mu\text{m}$ ？

## 實驗二、三 動植物細胞

細胞為生物體構造與功能的基本單位，從最簡單的細菌到構造最複雜的動植物體，都是由細胞構成。動植物的細胞基本構造可分為細胞膜、細胞質、細胞核等三大部分。細胞膜為細胞質外圍的一層膜狀的構造，對於物質的進出有選擇的能力，因此具有調節細胞內含物之功能。細胞膜以內至細胞核以外的原生質部分稱為細胞質，內含有許多胞器(organelles)，如粒線體等。

除原核生物，一般細胞內都有細胞核的構造。細胞核的形狀通常為圓形或卵圓形，由核膜、核液(karyoplasm)、染色體以及核仁(nucleolus)等組成。

植物細胞在細胞膜外尚有一層細胞壁的構造，具有維持細胞的形狀、防禦外來的侵害、以及防止因吸水過多而爆破破裂等功能。

細胞進行新陳代謝時，常會產生許多物質：如澱粉粒、油滴、結晶、分泌物等。其中結晶為植物細胞中的代謝衍生物與鈣結合而成，可避免累積過多的衍生物造成毒害。

### 植物細胞

#### 實驗材料

洋葱、馬鈴薯

香蕉、辣椒

秋海棠、鴨跖草

印度橡膠或榕樹葉

#### 實驗步驟

##### 1. 表皮細胞(Epidermal cell)

取洋葱一片鱗葉，利用鑷子撕下小塊表皮組織，然後將它放在載玻片上並且滴上一滴水使組織展開，最後覆上蓋玻片置顯微鏡下觀察。

##### 2. 澱粉粒(Starch grain)

以刀片刮取馬鈴薯截面，塗抹於載玻片上，加水覆上蓋玻片，置顯微

鏡下觀察。

可見各細胞中有許多澱粉粒（呈圓形或卵圓形）。改用高倍鏡觀察，可發現澱粉粒在較小的一端有臍(Hilum)；以臍為中心，其周圍有輪紋。加碘液一滴後，觀察有何改變。

再用小刀刮取香蕉果肉少許，觀察其澱粉粒的形狀。

### 3. 雜色體(Chromoplast)

切取紅辣椒表皮薄片，置顯微鏡下觀察。細胞中有黃紅色小顆粒，即為雜色體。

### 4. 單晶&晶簇(Druse)

將秋海棠葉柄橫切一薄片，置顯微鏡下觀察。細胞中可看到八面體、柱狀或簇狀結晶，即為單晶&晶簇。此為草酸鈣結晶。

### 5. 針狀結晶(Raphide)

將鴨跖草莖橫切一薄片，置顯微鏡下觀察。可看到許多針狀結晶位於細胞中或散置細胞外。此亦為草酸鈣結晶。

### 6. 鐘乳體(Cystolith)

撕一片較老熟的印度橡膠或榕樹葉，以垂直於中央葉脈的方向橫切一薄片，置顯微鏡下觀察。在上表皮的一些細胞中可看到葡萄穗狀的碳酸鈣結晶，即為鐘乳體。

## 動物細胞

### 實驗材料

青蛙、豬肝、肥肉、魚鱗

### 實驗步驟

#### 1. 血球(Blood cell)

將蛙用針刺法破壞它的中樞神經，然後剪開心臟，用吸管吸取一小滴蛙的血液，放在載玻片的一側，再用另一張載玻片作薄片(Thin film)塗抹，等自然乾後，加上瑞特氏染料，染 1-2 分鐘後，用水輕輕洗去染料，然後將載玻片置濾紙內以吸去水滴，待乾後置顯微鏡下觀察蛙的紅血球與白血球，並注意細胞核的形狀。

## 2. 蛙的精子細胞(The sperm of frog)

自雄蛙腹腔內取出睪丸，放入盛有林格氏液燒杯內，用解剖刀將蛙的睪丸切碎，二分鐘後，自燒杯內吸取一小滴液體，滴在載玻片的中央，覆上蓋玻片，然後置顯微鏡下觀察細胞的形態及是否能夠運動。

## 3. 肝細胞(Liver cell)

將一小片豬肝置於滴有生理鹽水的載玻片上；塗抹後，加一滴甲基藍液，覆以蓋玻片，分別在低、高倍鏡下觀察。注意其細胞核的數目。

## 4. 色素細胞(Chromatophore)

取魚鱗片(勿除去鱗片表面之皮膚)一枚，置載玻片上，加一滴水，覆上蓋玻片，置於低倍鏡下，觀察細胞內色素顏色。

## 5. 脂肪細胞(Fat cell)

刮取肥肉少許在載玻片上塗成薄層，加蘇旦三號染色，覆上蓋玻片，分別置低倍鏡與高倍鏡下觀察，細胞內染成紅色部分者即為油滴。

### 問題

1. 任何細胞均具一個細胞核嗎？
2. 你所看到的精細胞形狀如何？
3. 脂肪細胞內之油滴大小是否均相同？其細胞核位於何處？

## 植物細胞



Fig1. 澱粉粒 (馬鈴薯) 100X

臍

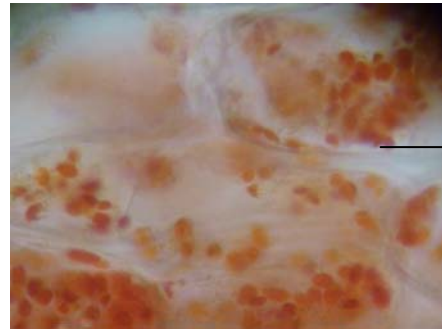


Fig2. 雜色體 (辣椒) 40X

雜色體

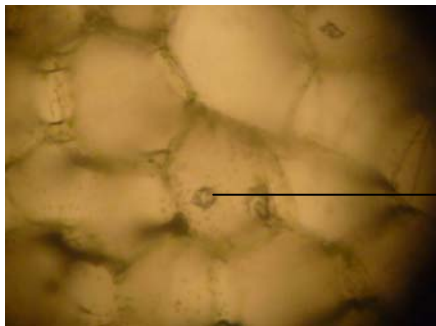


Fig3. 單晶 (秋海棠) 40X

單晶

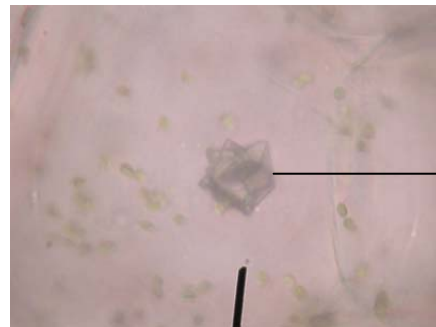


Fig4. 晶簇 (秋海棠) 400X

晶簇

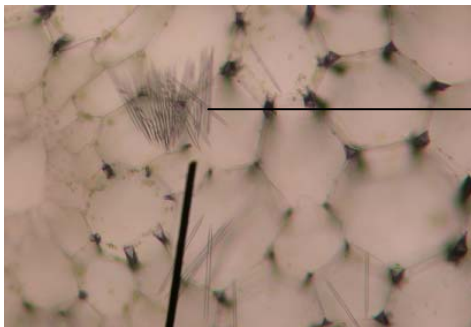


Fig5. 針狀結晶 (鴨趾草) 40X

針狀晶體

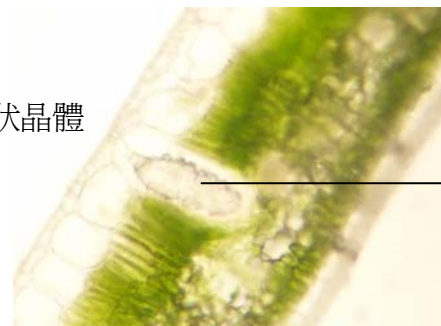


Fig6. 鐘乳體 (印度橡膠) 100X

鐘乳體

## 動物細胞

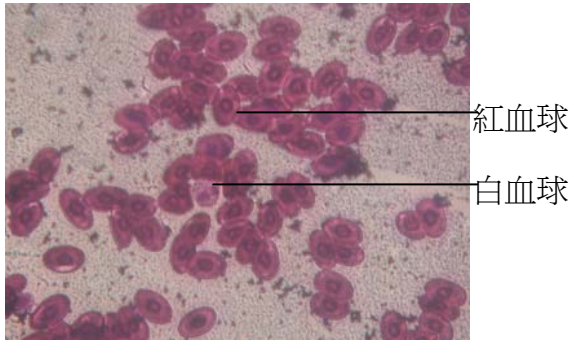


Fig1. 血球 (青蛙) 400X

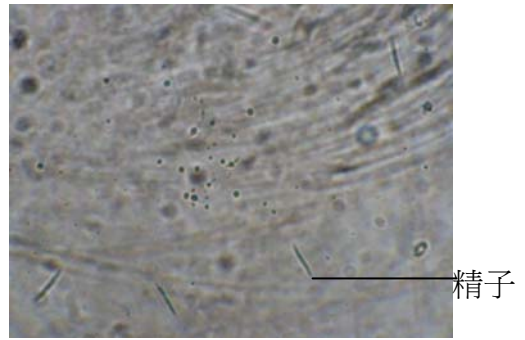


Fig2. 精子細胞 (青蛙) 100X

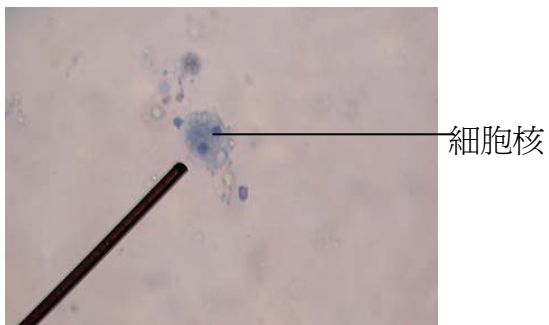


Fig3. 肝細胞 (豬) 400X

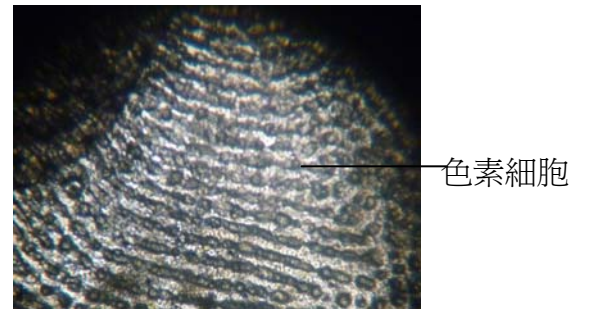


Fig4. 色素細胞 (吳郭魚) 100X

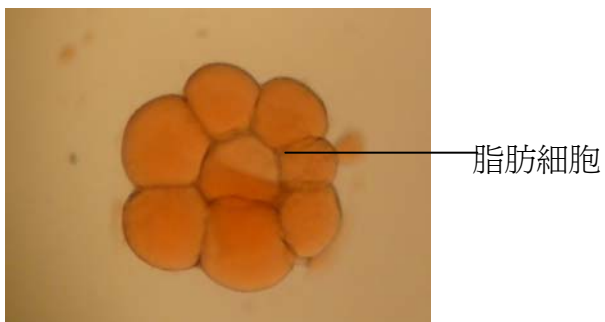


Fig5. 脂肪細胞 (豬) 400X

## 四大基本組織 (Four Basic Tissues)

脊椎動物細胞之形態、組成與排列方式之差異性極大，而個別細胞之功能除與其細胞本身之形態與排列相關外，更因其所在位置或其相鄰細胞之不同而有所差異。如要根據所有之各種細胞予以個別之說明與討論，既不容易亦無法了解其細胞間之相關性。因此根據各種細胞在胚胎發育、形態表現及功能執行上予以歸納，將具有類似形態特徵與功能表現之細胞群予以分類成為四種基本組織：



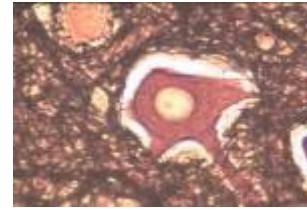
上皮組織 (Epithelial Tissue)



結締組織 (Connective Tissue)



肌肉組織 (Muscle Tissue)



神經組織 (Nerve Tissue)

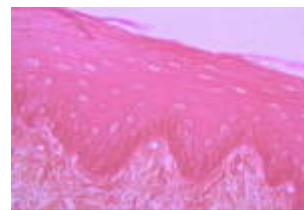
---

## 上皮組織 (Epithelial Tissue)

上皮組織的特徵是細胞密度大，細胞間質小，覆於體表或形成體內管腔的襯裡。此外，身體內各式外分泌性腺體及部分的內分泌性腺體，在胚胎發育時期也是經由上皮組織所特化形成。上皮組織分別起源於胚胎時期的外胚層與內胚層，其間並無血管之分佈，底面附著於結締組織之上，結締組織與上皮組織連接處稱為基底膜 (basement membrane)，上皮組織經由特殊細胞結合方式 (cell junctions : hemidesmosomes) 附著於基底膜上。上皮組織在分類上依細胞層數可分為兩類



單層上皮組織 (Simple Epithelium)



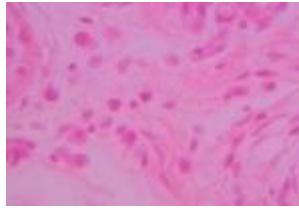
複層上皮組織 (Stratified Epithelium)

## 結締組織 (Connective Tissue)

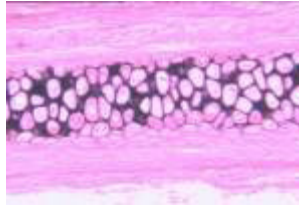
結締組織具有豐富的細胞間質 (extracellular matrix)，其細胞之密度較低且細胞體型也較小，細胞分散於細胞間質之間。結締組織的細胞間質由成形的纖維 (fibers)、膠狀的基質 (ground substance) 及組織液 (tissue fluid) 所組成。其中纖維因組成成份之不同，可區分為膠原纖維 (collagen fiber)，彈性纖維 (elastic fiber) 及網狀纖維 (reticular fiber) 三種。

成體的結締組織因其內細胞的組成、纖維的種類、數量與排列方式以及間質的性質區分為一般性結締組織 (connective tissue proper) 及特殊性結締組織 (special connective tissue) 兩大類。另外在胚胎時期之結締組織因其特性上不同，故常被獨立出來討論。

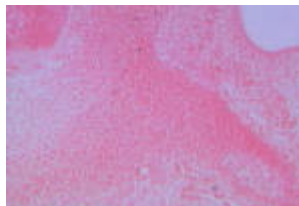
### 一般性結締組織 (Connective Tissue Proper)



### 特殊性結締組織 (Specialized Connective Tissue)



### 胚胎結締組織 (Embryonic Connective Tissue)



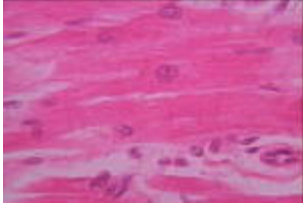




## 肌肉組織 (Muscle)

肌肉組織主要由肌細胞組成，肌細胞為細長的細胞，故亦稱肌纖維 (muscle fiber)。肌纖維被纖細的結締組織所包裹，有時形成片狀或塊狀的肌肉。肌細胞的縮短稱為收縮，這種收縮的能力來自於肌細胞內所含細絲狀的收縮蛋白：肌動蛋白 (actin) 及肌凝蛋白 (myosin)。兩種蛋白質絲以分解 ATP 產生能量，藉以產生彼此間相互滑動之結果。在橫紋肌中，肌動蛋白與肌凝蛋白的排列非常有規則，使肌細胞內有典型的橫帶或橫紋出現；而在平滑肌，因其細胞之肌凝蛋白與肌動蛋白的排列較不規則，故無明顯可見之明暗條紋。橫紋肌一般的收縮速度較快但也較易疲勞，而平滑肌收縮較慢且能持久收縮。其中隨意肌 (如：骨骼肌) 的神經支配屬於腦脊髓系統 (cerebrospinal system)，由大腦皮質的最高運動中心所控制。而不隨意肌 (如：心肌，平滑肌) 則由自主神經支配或由內分泌系統調節，並不直接接受大腦皮質的影響。

肌肉組織按其構造，功能及發育可分為三類：

形態	組織名稱	核的位置	橫紋	肌纖維形狀	肌間盤
	<u>平滑肌</u> <b>(Smooth Muscle)</b>	細胞中央	無	紡錘狀	無
	<u>骨骼肌</u> <b>(Skeletal Muscle)</b>	細胞邊緣	有	長圓筒狀	無
	<u>心肌</u> <b>(Cardiac Muscle)</b>	細胞中央	有	分支圓筒狀	有

## 神經組織 (Nervous Tissue)

神經系統 (nervous system) 由解剖構造與胚胎發育來源上可分為中樞神經系統 (central nervous system - CNS) 及周圍神經系統 (peripheral nervous system - PNS) 等兩大部份。其主要由下列細胞或組織所構成：

### (1) 神經元 (neuron)：

神經元為特化而能接收、傳遞刺激或產生反應的細胞，其細胞核較一般細胞為大、呈圓形，常規染色下淡染色且有明顯之核仁。神經細胞多具有細胞突起形成之軸突 (axon) 與樹突 (dendrites)。

### (2) 神經膠質細胞 (neuroglia)：

神經膠細胞包括星狀細胞 (astrocyte)，寡突細胞 (oligodendrocyte) 及微膠細胞 (microglia) 等三種細胞。其中星狀細胞負責中樞神經系統之營養與支持，並與微血管形成血腦障壁 (blood-brain barrier)，提供中樞神經系統中穩定而不受干擾之微環境 (microenvironment)。寡突細胞主要在中樞神經系統內形成髓鞘 (myelin sheath) 提供神經電位傳導上之絕緣，一個寡突細胞可同時與多條神經軸突形成多個髓鞘。微膠細胞為中樞神經系統內之巨噬細胞，主要功能在吞噬壞死或不正常之組織或細胞。

### (3) 許旺氏細胞 (Schwann's cell)：

許旺氏細胞可包纏一條神經纖維 (有髓鞘神經) 形成單一髓鞘，或圍繞多條神經纖維 (無髓鞘神經) 提供周圍神經纖維在電位傳導上之絕緣，支持與保護之功能。

### (4) 腦膜 (meninges)：

腦膜為中樞神經系統外特化之結締組織，可分為硬腦膜 (dura mater)、蜘蛛膜 (arachnoid) 及軟腦膜 (pia mater) 三層。提供中樞神經系統物理性支持與保護。

### (5) 結締組織：

周圍神經系統之結締組織分為神經外膜 (epineurium)，神經束膜 (perineurium) 及神經內膜 (endoneurium) 由外向內將神經分隔成不同束狀區域，有豐富的血管分布其間提供營養的功能。



中樞神經系統

(central nervous system)



周圍神經系統

(peripheral nervous system)

## 實驗十一 ABO 血型鑑定及免疫血球細胞觀察

人體對抗外來因子（如：細菌、病毒）感染的方式可分為兩類：一種是非特化防禦機制，如：皮膚、黏膜、吞噬型白血球、抗微體蛋白等；另一種則為特化的防禦機制（免疫系統）如：淋巴球、抗體。本實驗即是利用人體紅血球的抗原—抗體原理，藉由凝集反應的有無來鑑定血型。另外再利用劉氏染色法觀察各式白血球。

### ABO 血型鑑定

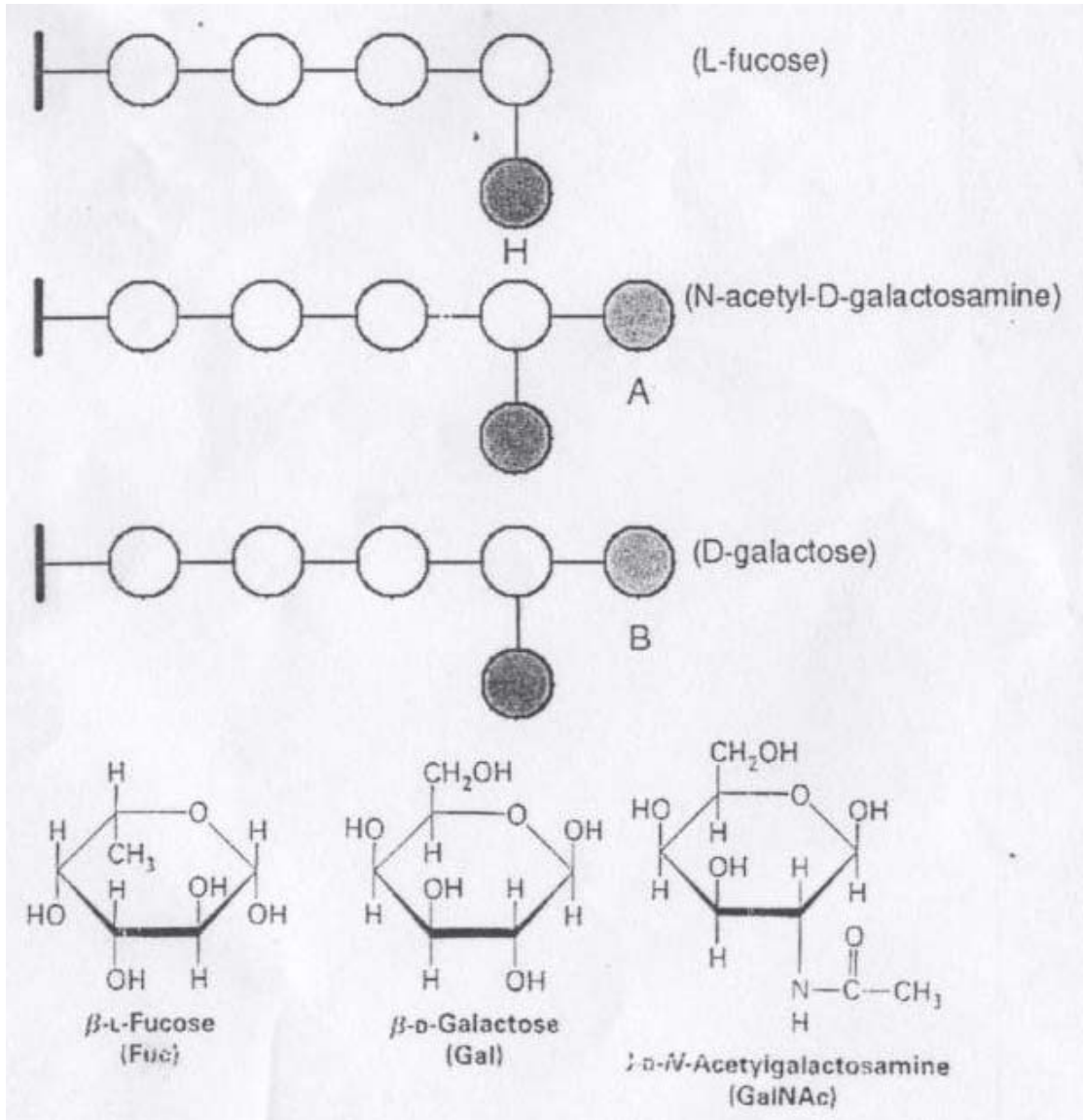
#### 一、原理

各血型血球所帶的抗原與血清中的抗體：

血型	Red blood cell antigen		Serum antibody	
	A	B	anti-A	anti-B
A	+	-	-	+
B	-	+	+	-
AB	+	+	-	-
O	-	-	+	+

由於 A 血型的血液帶有 A 抗原 (N-acetyl-D-galactosamine, 如下圖)，因此當其血液碰到 anti-A 抗體即會發生凝集反應

(agglutination)。同理，B 血型血液會對 anti-B 抗體發生凝集反應。AB 型血液則對 anti-A, anti-B 都會發生凝集反應。O 型血球表面不帶任何抗原，因此對 anti-A, anti-B 都無反應。



### The H Antigen

- Base Structure (e.g. Glycoprotein)
- Galactose
- N-acetyl Glucosamine
- Fucose

Red blood cells from individuals of type

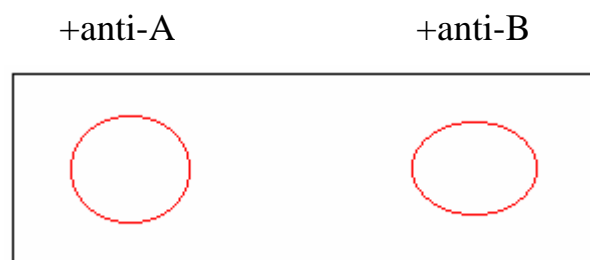
O A B AB

## 二、實驗材料

載玻片、酒精棉、採血針、抗 A 抗原抗體(anti-A antibody)、抗 B 抗原抗體(anti-B antibody)

## 三、實驗步驟

1. 取酒精棉擦拭、局部消毒指尖採血部位，並待酒精自然揮發
2. 以採血針自消毒指尖採血，由第二指節向指尖方向輕握施壓，使血液自採血處自然滲出，並將流出之第一滴血液拭去不用
3. 分別滴兩滴血液於載玻片上
4. 取一滴 anti-A 抗體與一滴 anti-B 抗體分別與上述兩滴血液混合，以牙籤輕微攪拌後，觀察凝集反應，判別血型

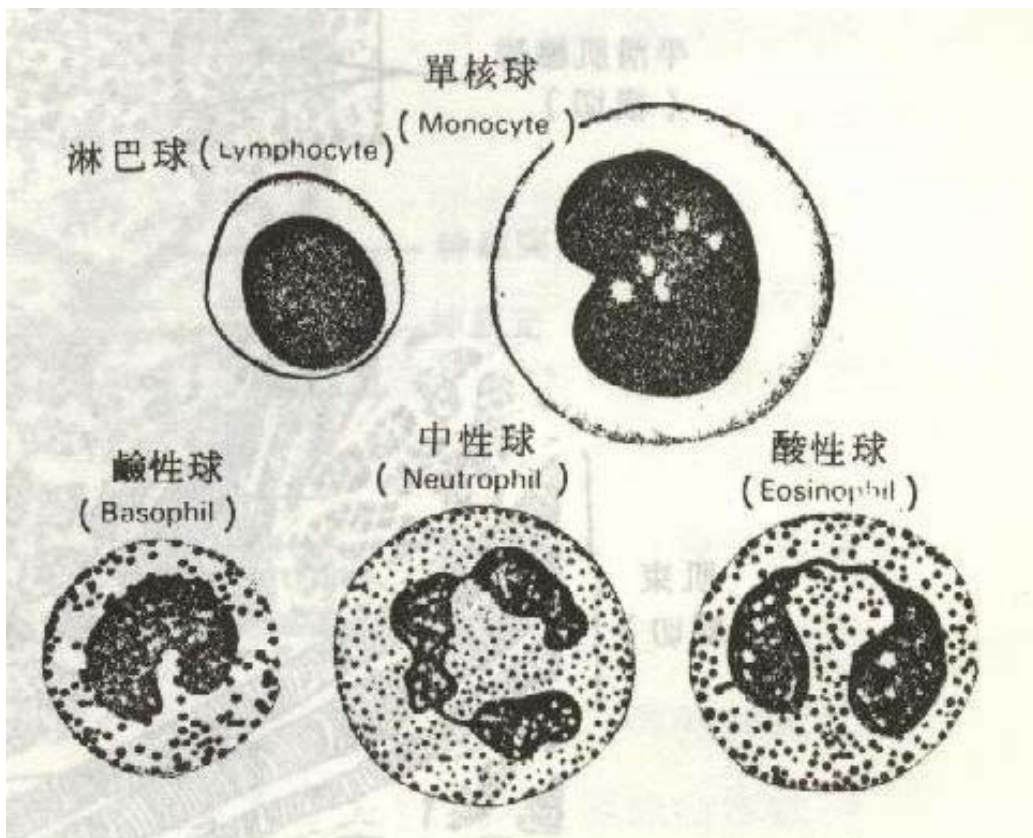


## 免疫血球細胞觀察

### 一、原理

人體的血液由紅血球、白血球、血小板和血漿組成。紅血球為雙凹圓盤狀，無核，直徑約  $7-8\mu\text{m}$ 。白血球可依其型態與功能分為下列數種：

白血球		佔白血球(%)	大小( $\mu\text{m}$ )	核型	顆粒
單核球		3-7	12-20	腎型	無
淋巴球		25-33	7-18	卵型	無
顆粒球	嗜中性球	65-80	10-15	3-5 葉	細小淺粉紅色
	嗜酸性球	2-4	10-15	2-3 葉	較大圓形紅色
	嗜鹼性球	0.5-1	12-17	不規則	大小不一藍色



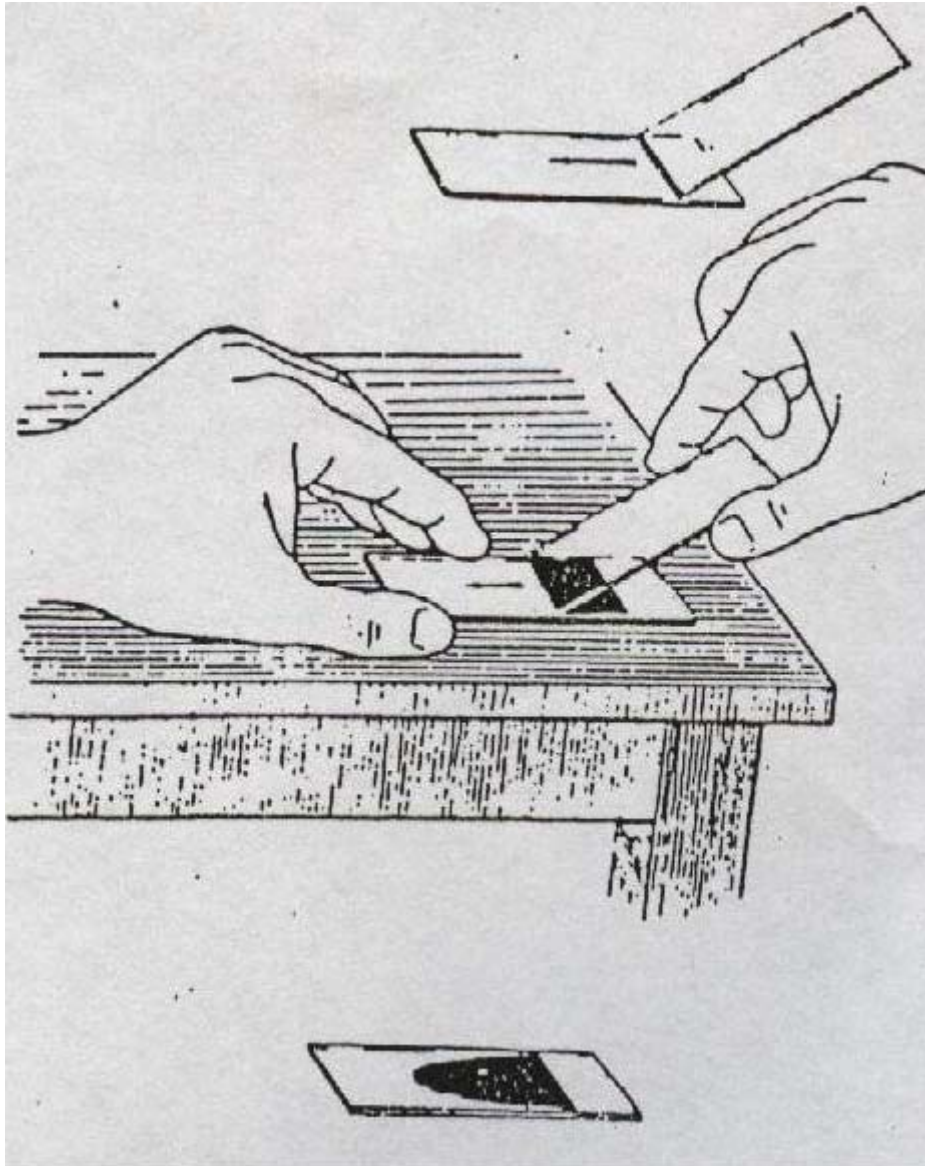
## 二、實驗材料

載玻片數片、酒精棉、採血針、劉氏染劑(Liu' s stain)、顯微鏡

## 三、實驗步驟

製作抹片：

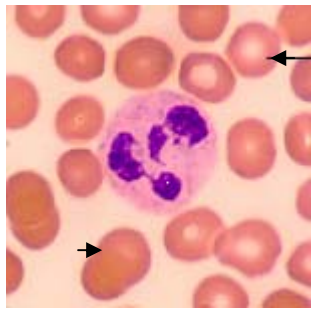
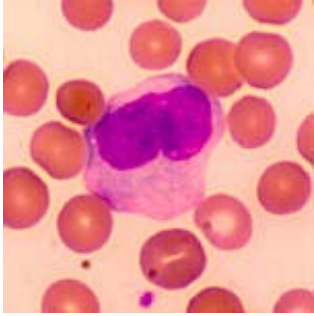
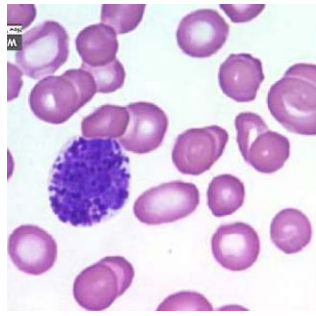
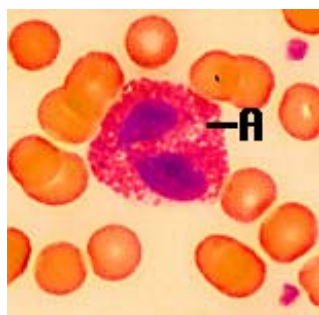
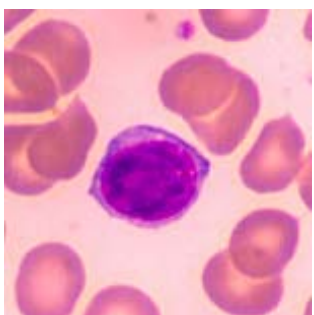
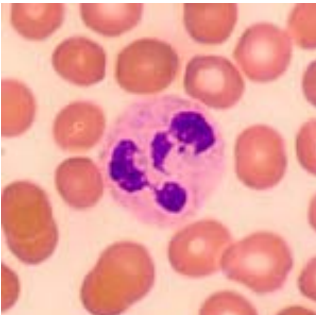
1. 準備乾淨載玻片兩片至數片
2. 取酒精棉擦拭、局部消毒指尖採血部位，並待酒精自然揮發
3. 以採血針自消毒指尖採血，由第二指節向指尖方向輕握施壓，使血液自採血處自然滲出，並將流出之第一滴血液拭去不用
4. 立即將一小滴血液滴於載玻片一側離邊緣約 1 公分處
5. 迅速將另一片載玻片以 40~45 度夾角接觸滴有血液之載玻片中段並向血滴位置移近至接觸血滴為止，此時血液會受到毛細作用牽引而填充於兩載玻片接觸線之間
6. 將上方之載玻片維持傾斜角度朝原相反方向快速而穩定推出，使血液均勻塗抹於載玻片上
7. 將抹片自然陰乾後染色



### 抹片染色

1. 以 Liu A 染劑均勻覆蓋於血液抹片 30 秒
2. 直接加上 Liu B 染劑，與 Liu A 染劑混合均勻後靜置 90 秒  
(Liu B 染劑的量需為 Liu A 染劑的兩倍)
3. 以細微流水將抹片上之染劑及沉澱物沖掉
4. 將染色完成之血液抹片陰乾後，即可置於顯微鏡下觀察



紅血球(erythrocyte)	單核球(monocyte)	嗜鹼性球(basophil)
		
嗜酸性球(eosinophil)	淋巴球(lymphocyte)	嗜中性球(neutrophil)
		

圖片來源: <http://www.unomaha.edu/hpa/blood.html>

\* 劉氏染劑(Liu' s stain)配方

Solution A: Methylene blue 0.5 gm  
Eosin yellow 1.7 gm  
Methyl alcohol 1,000 ml

Solution B: Azure 1.3 gm  
Methylene blue 1.4 gm  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  23.38 gm  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.50 gm  
Dist.  $\text{H}_2\text{O}$  1,000 ml

## 脊椎動物之循環系統

**實驗目的：**認識脊椎動物之循環系統在形態構造、生理運作以及調控機制上建立連續而完整之觀念。

### 實驗大綱：

1. 脊椎動物 (青蛙) 循環系統之解剖觀察實驗：學生透過對於青蛙之循環系統之實際解剖觀察，了解脊椎動物之心臟、動脈及靜脈之名稱、位置與分布。
2. 人體血壓測量及心跳實驗：學生實際利用水銀及電子血壓計測量血壓及心跳數值，並實驗不同程度之運動量對於心跳及血壓之影響。

### 實驗材料：

青蛙

解剖器械：(穿刺針、大剪、小剪、鑷子、解剖臘盤、大頭針)

動脈染劑

電子式自動血壓計

水銀血壓計

### 實驗步驟：

#### 實驗 1 - 青蛙之循環系統形態觀察實驗：

- A. 乙醚麻醉法 (此步驟由助教或老師協助處理)
  1. 將青蛙置於標本缸中，倒入適量乙醚。
  2. 待青蛙不再有任何動作，且腹部呈現微紅現象，此時即已麻醉完成。
- B. 青蛙解剖
  1. 將麻醉完成的青蛙以清水反覆搓洗，再將蛙腹部朝上放置於解剖盤中，四肢以大頭針固定。
  2. 用鑷子將蛙腹部皮膚夾起，以解剖刀(或小剪)將皮膚由腹部往胸部以工字形劃開(剪開)，將皮膚打開並用大頭針固定。
  3. 用鑷子將蛙腹部肌肉夾起，以解剖刀(或小剪)將肌肉由腹部往胸部以” ][ ” 形劃開(剪開；即避開中線的腹大靜脈)，將

肌肉打開並用大頭針固定。

4. 將中線的肌肉挑起，由側面觀察腹大靜脈的走向。在不傷及腹大靜脈的情況下，將前、後端的肌肉剪斷。

5. 將胸骨剪開，調整青蛙前肢姿勢，使青蛙心臟露出。

#### C. 注射染劑

1. 將青蛙心臟表面的圍心膜(亮銀色)以鑷子及小剪剝掉，找到動脈錐的位置。

2. 以鑷子及小剪將動脈錐與心房間的膜狀結締組織弄破，使縫衣線繞過動脈錐的背端(靠近心房處)，再將線於動脈錐打個活結(如圖)。

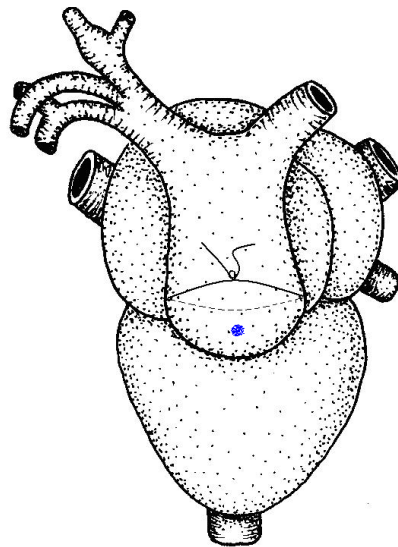
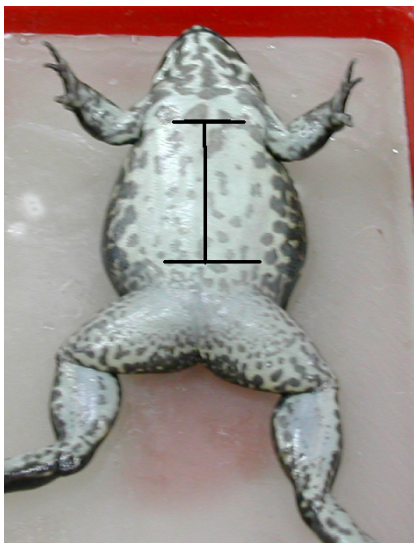
3. 在水槽以自來水裝入針筒，測試針頭有無堵塞。若針頭測試正常，將針筒裝入 2 至 3cc 的染劑，裝上針頭。

4. 以鑷子輔助，將針筒內的染劑由動脈錐近基處注射入動脈幹(1 至 2cc；如圖中的藍色圓點處)。注射完畢後，將針頭拔出，立即將線勒緊，以防止染劑逆流。

#### D. 循環系統觀察

1. 由於染劑中含有甘油，具有黏滯性，因此將會於停滯於微血管中，不會進一步流入靜脈。所以將染劑注入 3 分鐘後，即可觀察蛙的動脈(螢光紅色)和靜脈(暗紅色)系統。腹面的血管觀察完後，將器官撥開，觀察背面(近蛙脊椎骨處)的背大動脈及其他血管。

2. 觀察完的蛙體一律集中於講桌前的垃圾桶，再由清潔人員統一焚化處理。



## 實驗 2 - 人體血壓測量及心跳實驗：

本部分實驗目的主要訓練了解血壓計之運作原理、並學生使用如何正確使用水銀血壓計及自動電子血壓計。

### A. 靜止時的血壓測量：

1. 受測者安靜坐下 3 分鐘後開始測量，測量時將上臂前舉手肘輕鬆靠於桌面，與心臟約略同高。
2. 將氣囊袖袋圈套上臂，調整袖袋上魔鬼膠使鬆緊程度適當不致有壓迫上臂現象，在袖袋下方置入聽診器，找出動脈位置。
3. 使充氣囊袋緊貼肢體，均勻壓迫動脈。
4. 將加壓用充氣球前方洩氣閘門旋鈕旋緊後，擠壓充氣球將氣囊袖袋加壓充氣至 190mmHg 左右，稍微暫停，此時因氣囊袖袋壓力大於血壓而壓緊動脈阻止血液流通，因此聽診器應無聲音傳回。加壓時應避免超過 220mmHg 以免造成受測者不適與疼痛。
5. 隨後停止加壓並稍微旋開洩氣閘，開始持續降壓洩氣，同時注意聆聽聽診器傳回聲音訊息，當氣囊袖袋之壓力降至低於心臟收縮壓時，血液受血壓推擠流過受壓迫而狹隘之動脈時撞擊動脈管壁產生擾流聲響，由聽診器傳回之第一個擾流聲時之壓力即為收縮壓。
6. 持續降壓洩氣過程時，由聽診器傳回之血液流動聲，因可流通過受壓變形區域動脈內血流量增加而訊號逐漸增大；隨後因受壓迫變形之動脈在袖袋氣囊持續降壓過程逐漸回復原本管徑，其中流動之血液撞擊管壁情形也逐漸降低，因而由聽診器傳回之血液流動聲開始越來越小；當氣囊袖袋壓力低於心臟之舒張壓時，動脈管壁不再受壓變形而管徑回復，其中流動血液亦不再與狹隘之管壁撞擊而發出聲響，因此，當聽診器傳回血液流動聲消失時之壓力即為心臟之舒張壓。
7. 同樣以電子式血壓計進行血壓測量。

### B. 運動過後的血壓測量：

1. 請受測者小跑步風雨球場一圈；
2. 以水銀血壓計或電子式血壓計測量剛運動完及 5 分鐘後的血壓。

## 免疫組織化學染色

### 一、免疫組織化學染色之原理：

免疫組織化學染色主要利用抗體之專一性結合方式，藉以標定出組織內特定抗原所在之位置。但因抗體本身亦無法直接觀察，故需在抗體上結合可觀察之標定物或呈色劑，一般上經常使用之標定物或呈色劑包括重金屬顆粒 (如黃金)、螢光物質 (如 FITC, TRITC, TAXAS red 等)、及酵素 (如 peroxidase) 等。因免疫組織化學染色法在對特定物質之染色或標定上較傳統之組織化學染色法為高、且具有專一性，故在研究及臨床診斷上極為重要。

### 二、抗體：

抗體又稱免疫球蛋白 (immunoglobulin)，為當身體免疫系統接觸外來物質時，免疫系統根據所接觸外來物質之抗原性，誘導 B 淋巴球 (B lymphocyte) 特化成為特定之漿細胞 (plasma cells)，以分泌針對此抗原專一性結合之抗體。人類之抗體可分為五大類，分別為 IgG (約佔血液中抗體數目之 80%)、IgA (約佔血液中抗體數目之 15%)、IgM (約佔血液中抗體數目之 5%)、IgD (含量低於血液中抗體總數之 1%) 及 IgE (含量低於血液中抗體總數之 1%) 等五大類。抗體之基本結構包含由胺基酸序列所組成之兩條重鏈及兩條輕鏈，其中輕鏈與重鏈間及重鏈與重鏈間經由雙硫鍵 (disulphide bond) 結合成 "Y" 形。其中 "Y" 形分叉之兩端為可變異區 (包含輕鏈及重鏈之前半部)，針對不同抗原結合之抗體其可變異區之胺基酸序列亦不相同；而 "Y" 形之柄部 (由重鏈之後半部分所組成) 稱為固定區，屬同一大類之抗體其固定區之胺基酸序列均相同。

由於免疫系統在辨識抗原之過程，同一個外源性構造或分子可於其構造之表面多處同時誘發而產生不同之抗原反應，因而產生多株針對其表面不同之抗原區域 (epitopes) 結合之抗體。因此，將這些可對同一物質之不同抗原區域結合的不同株抗體合稱為該物質之多株抗體 (polyclonal antibodies)。如在免疫反應誘導後將針對單一抗原區域產生抗體之漿細胞予以個別分離純化，經與癌細胞融合後分離培養，經篩檢後可得到只產生針對單一種抗原區域專一結合抗體之融合瘤，所產生之抗體純化後稱為該抗原之單株抗體 (monoclonal antibodies)。單株抗體因只與單一抗原結合位置故具備高度之專一性與敏感性，但對於免疫反應之環境要求也較為嚴格，包括 pH 值、溫度、離子濃度等。相對的多株抗體則因其結合位置之親和性與專一性之間差異較大，且有較高之非專一性結合情形發生，但因多株抗體對反應所需之環境允許範圍較廣，可適合在未知條件下之免疫化學反應進行。

### 三、染色方式：

免疫組織化學染色原理上雖然都是運用抗體之專一性結合能力在組織中進行標定，但在實際應用會根據實驗之目的與需求上的不同，採用不同之免疫染色法。

1. 直接免疫染色法 (direct method)：直接免疫染色法主要利用在針對特定抗原之抗體上直接結合或標定上可供識別之呈色劑。依照呈色方式與成分之不同，可區分為：酵素、膠體金以及螢光染料等。直接免疫染色法當抗體結合上組織中抗原之同時帶上呈色劑，在操作之程序上最為簡便，但如組織中抗原含量較低時，其染色之效果不佳。
2. 間接免疫染色法 (indirect method)：間接免疫染色法由直接免疫染色法改良而來，當初級抗體 (primary antibody) 結合上抗原後，再以所用之初級抗體為目標或抗原，利用標定過呈色劑之二級抗體 (secondary antibody)、protein A、Avidin-biotin...等再去結合初級抗體。由於初級抗體上可提供抗原結合之反應位置增加，因此所能標定上之二級抗體在數量上遠超過初級抗體之數量，亦即在這種染色過程中可將訊號予以放大，對於一些原本組織中抗原含量不高的觀察上均能有相當不錯之效果。

### 四、呈色劑 (chromogens)：

呈色劑之目定在使組織中原本無法進行觀測、區別之抗體位置能夠呈現，目前常用之免疫組織染色法根據呈色劑之機制與原理之不同，可分為下列四類。

- 酵素：
  - 將酵素結合在抗體上，利用酵素作用將透明而水溶性之受質 (substrates) 反應成為有顏色且不可溶之物質而呈現。一般實驗及研究中最常用來與抗體結合標定之酵素為 HRP，而使用最廣泛之呈色劑為 DAB，經反應後成為有顏色之深棕色產物、且不會溶於常規染色流程中之酒精與二甲苯等溶劑。
- 膠體金：
  - 利用還原方式製備，將氯化金 (AuCl) 溶液之金離子還原成極細小金球稱為膠體金，在與抗體適當結合後做為成像標定之用。一般膠體金之直徑低於光學顯微鏡之解像能力，因此無法作為光學顯微觀察時做為標定呈色之用，多應用於穿透電子顯微鏡之免疫染色。

- 螢光染劑：

- 螢光染劑能吸收波長較短而能量較高之激發光源照射的同時釋放出波長較短而能量較低之螢光，因此當以螢光物質與抗體結合後做為細胞組織中特定抗原染色之用，可藉由螢光產生來辨別組織中該特定抗原之位置。如將經螢光染色之切片置於一般之光學顯微鏡中觀察時，因其所產生之螢光相對較弱且常為背景光線所遮蓋而無法觀測，因此需使用經特殊設計能將激發光與螢光分別進行分離、過濾而達成像目地之螢光顯微鏡來進行觀察。

- 放射線同位素：

- 利用帶有放射線同位素之抗體進行染色標定之切片，並無法直接以任何種類之顯微鏡進行觀測。在染色標定完成後，須在組織切片上塗覆上一層適當之感光乳膠，利用放射線同位素衰變過程所釋放之射線或粒子撞擊乳膠中溴化銀等感光物質所引發曝光反應，經一段時間後以類似底片顯像沖洗方式而成像。

免疫組織化學染色對於特定抗原之呈現上雖具有相當高度之專一性，但實際應用時常受抗體濃度、作用環境（如溫度、鹽類環境、pH 值）、組織結構與固定狀態、染色時間、抗體結合能力、抗原呈現狀態...等因素，而有相當大之差異，實驗操作者應針對所購入或自製的不同抗體株進行測試，並建立其合適之染色操作流程。而對於染色結果亦需進行相同操作流程但未加入一級抗體的負染色以茲對照，確定所標定呈現均為抗體專一性反應所致。

## 五、對照染色：

免疫組織化學染色對於特定抗原之呈現上雖具有相當高度之專一性，但實際應用時常受抗體濃度、作用環境（如溫度、鹽類環境、pH 值）、組織結構與固定狀態、染色時間、抗體結合能力、抗原呈現狀態...等因素，而有相當大之差異，實驗操作者應針對所購入或自製的不同抗體株進行測試，並建立其合適之染色操作流程。而對於染色結果亦需進行相同操作流程但未加入一級抗體的對照染色（又稱負染色）以茲對照，確定所標定與呈現均為抗體專一性反應所致。

免疫組織化學染色流程		date		
Name				
凡士林畫圈				
PBS wash 5min		10:00		
Serum blocking 20min 37°C		10:10		
Primary Antibody 60min 37°C		10:30		
PBS wash 10min*2	1st	11:40		
	2nd	11:50		
Secondary Antibody 50min 37°C		12:00		
PBS wash 10min*2	1st	13:00		
	2nd	13:10		
DAB 染色		13:20		
流水 10min		13:45		
Hematoxylene 20min		14:00		
流水 15min		14:20		
0.5% HCl in 95% Alcohol 1~2 次		14:35		
流水 15min		14:35		
飽和 Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3min		14:50		
75% Alcohol 5 次		14:55		
85% Alcohol 5 次		14:56		
95% Alcohol 1min		14:58		
100% Alcohol 1min		15:00		
100% Alcohol 5min		15:05		
100% Alcohol 5min		15:10		
Xylene 1min		15:15		
Xylene 1min		15:20		
Xylene 1min		15:25		
封片		15:30		
烘乾 72hr 60°C		16:00		

PBS：0.01M 磷酸緩衝溶液，pH 7.4

DAB：3,3'-diaminobenzidine, 免疫組織化學染色之呈色劑