

第一章：显微镜的几个重要光学技术参数

在镜检时，人们总是希望能清晰而明亮的理想图象，这就需要显微镜的各项光学技术参数达到一定的标准，并且要求在使用时，必须根据镜检的目的和实际情况来协调各参数的关系。只有这样，才能充分发挥显微镜应有的性能，得到满意的镜检效果。

显微镜的光学技术参数包括：数值孔径、分辨率、放大率、焦深、视场宽度、工作距离、覆盖差等。这些参数并不都是越高越好，它们之间是相互联系又相互制约的，在使用时，应根据镜检的目的和实际情况来协调参数间的关系，但应以保证分辨率为准。

1. 数值孔径: (Numerical aperture) 简写 NA

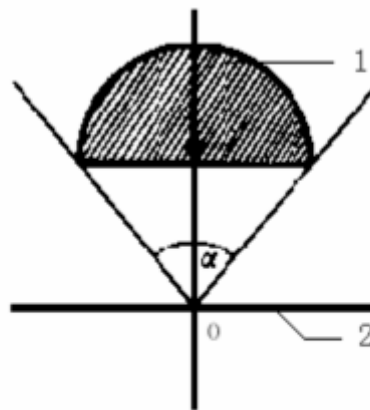


图 1-2 物镜的光线入射角
1. 物镜前透镜 0. 目的物
2. 标本玻片 a. 入射角

数值孔径是判断物镜性能（分辨率，焦深和亮度）的关键要素，计算公式如下：

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

n = 试样与物镜之间介质的折射率（空气： $n=1$ 、油： $n=1.515$ ）

u ：孔径角又称“镜口角”，是物镜光轴上的物体点与物镜前透镜的有效直径所形成的角度，也是光轴与离物镜中心最远折射光形成的角度。孔径角越大，进入物镜的光通亮就越大，它与物镜的有效直径成正比，与焦点的距离成反比。

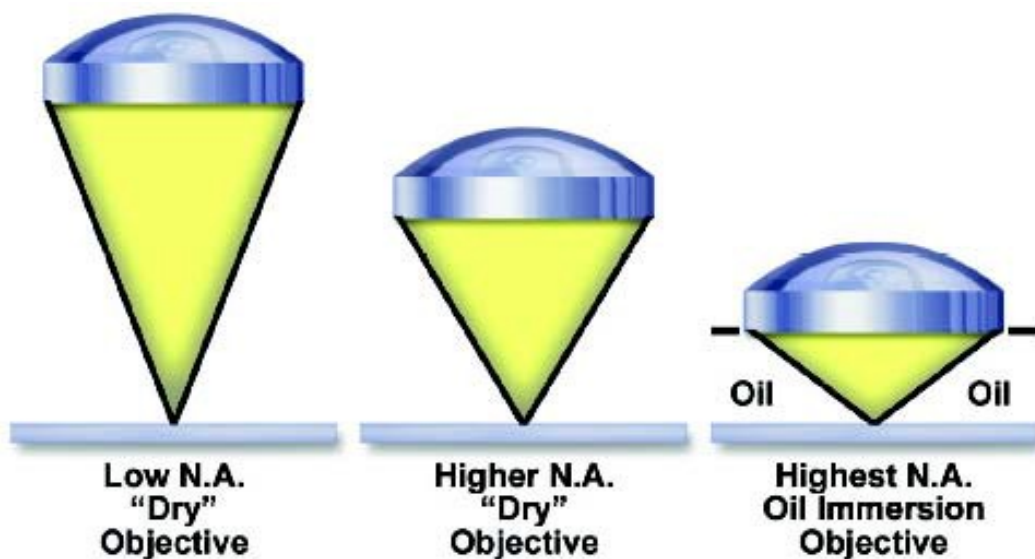
空气的折射率为 $n=1$ ，孔径角最大不能超过 180 度，否则会因为物镜工作距离等于零而

无法工作。 $\sin(180/2)=1$ ，所以空气介质的 NA 值小于 1。

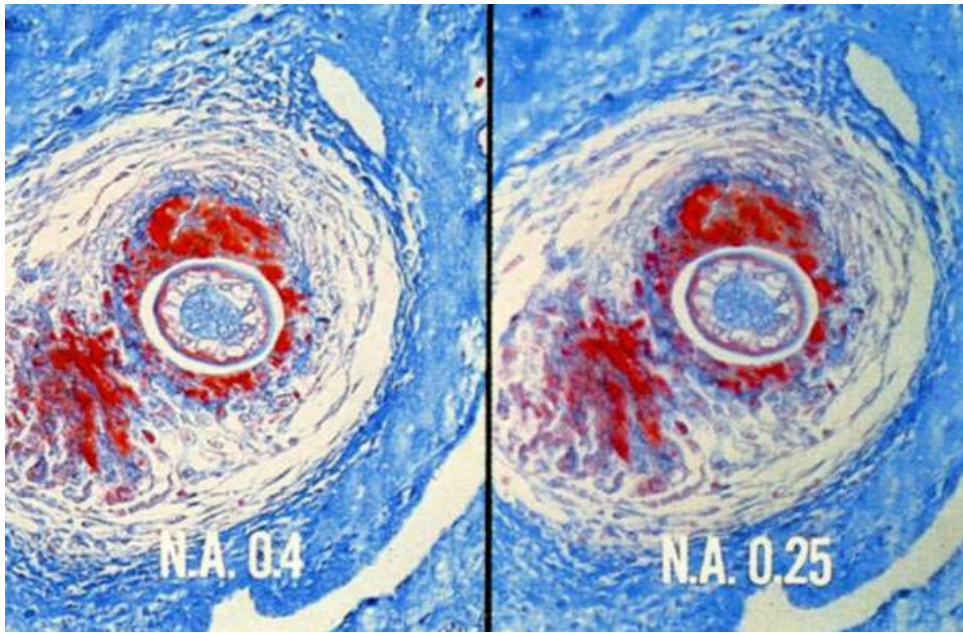
显微镜观察时，若想增大 NA 值，孔径角是无法增大的，唯一的办法是增大介质的折射率 n 值。基于这一原理，就产生了水浸系物镜和油浸物镜，因介质的折射率 n 值大于 1，NA 值就能大于 1。

数值孔径最大值为 1.4，这个数值在理论上和技术上都达到了极限。目前，有用折射率高的溴萘作介质，溴萘的折射率为 1.66,所以 NA 值可大于 1.4。

这里必须指出，为了充分发挥物镜数值孔径的作用，在观察时，聚光镜的 NA 值应等于或略大于物镜的 NA 值，数值孔径与其他技术参数有着密切的关系，它几乎决定和影响其他各项技术参数。它与分辨率成正比，与放大率成正比，与焦深成反比，NA 值增大，视场宽度与工作距离都会相应地变小。



2. 分辨率 (Resolving power)



分辨率又称“鉴别率”，“解像力”。是衡量显微镜性能的又一个重要技术参数。

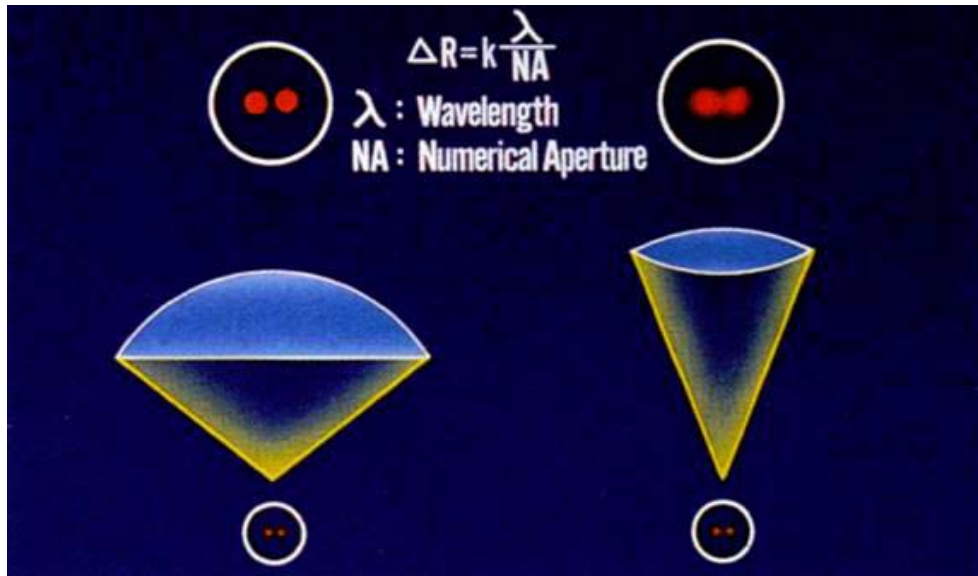
显微镜的分辨率用公式表示为： $d = \lambda / NA$ 式中 d 为最小分辨距离； λ 为光线的波长；

NA 为物镜的数值孔径。可见物镜的分辨率是

由物镜的 NA 值与照明光源的波长两个因素决定。 NA 值越大，照明光线波长越短，则 d 值越小，分辨率就越高。

要提高分辨率，即减小 d 值，可采取以下措施：

- (1) 降低波长 λ 值，使用短波长光源。
- (2) 增大介质 n 值和提高 NA 值 ($NA = n \times \sin(u/2)$)。
- (3) 增大孔径角。
- (4) 增加明暗反差。



提高分辨率的效果如上图

3. 放大率 (Magnification)

放大率就是放大倍数，是指被检验物体经物镜放大再经目镜放大后，人眼所看到的最终图象的大小对原物体大小的比值，是物镜和目镜放大倍数的乘积。放大率也是显微镜的重要参数，但也不能盲目相信放大率越高越好，在选择时应首先考虑物镜的数值孔径。

有效放大倍率：显微镜放大倍率的极限即有效放大倍率。分辨率和

放大倍率是两个不同的但又互有联系的概念。有关系式：

$$500NA < \text{放大率} < 1000NA$$

当选用的物镜数值孔径不够大，即分辨率不够高时，显微镜不能分清物体的微细结构，此时即使过度地增大放大倍率，得到的也只能是一个轮廓虽大但细节不清的图像，称为无效放大倍率。反之如果分辨率已满足要求而放大倍率不足，则显微镜虽已具备分辨的能力，但因图像太小而仍然不能被人眼清晰视见。所以为了充分发挥显微镜的分辨能力，应使数值孔径与显微镜总放大倍率合理匹配。根据：

总放大率 = 物距/物镜焦距×相距 (250mm) /目镜焦距；增大物距即镜筒长度，可

以提高放大率，但是镜筒不能无限拉长，通常国际标准长度

为160mm。

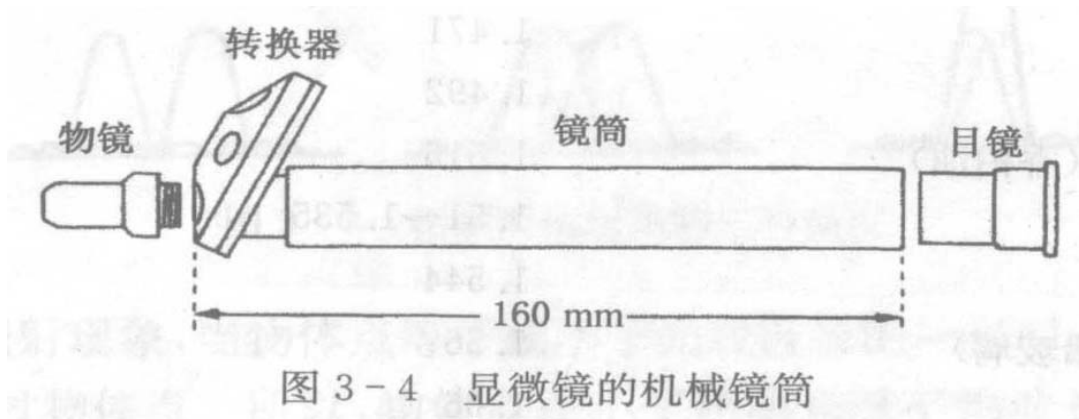
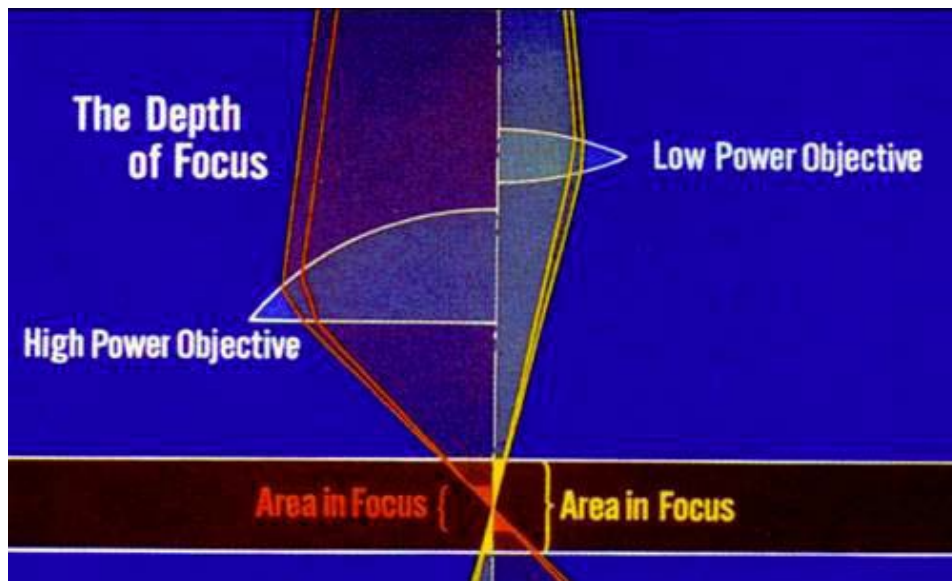


图 3 - 4 显微镜的机械镜筒

4. 焦深 (Depth of focus)

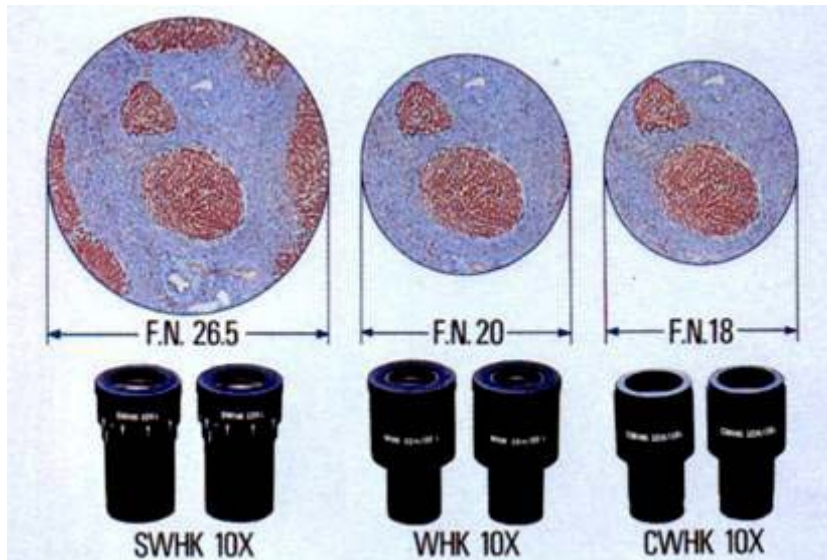


焦深为焦点深度的简称，即在使用显微镜时，当焦点对准某一物体时，不仅位于该点平面上的各点都可以看清楚，而且在此平面的上下一定厚度内，也能看得清楚，这个清楚部分的厚度就是焦深。焦深大，可以看到被检物体的全层，而焦深小，则只能看到被检物体的一薄层，焦深与其他技术参数有以下关系：

- (1) 焦深与总放大倍数及物镜的数值孔径成反比。
- (2) 焦深大，分辨率降低。由于低倍物镜的景深较大，所以在低倍物镜照相时造成困难。在显微照相时将详细介

绍。

5. 视场直径 (Field of view)



观察显微镜时，所看到的明亮的原形范围叫视场，它的大小，是由目镜里的视场光阑决定的。视场直径也称视场宽度，是指在显微镜下看到的圆形视场内所能容纳被检物体的实际范围。视场直径愈大，愈便于观察。计算公式如下：

$$F = FN / \text{Mob}$$

F: 视场直径

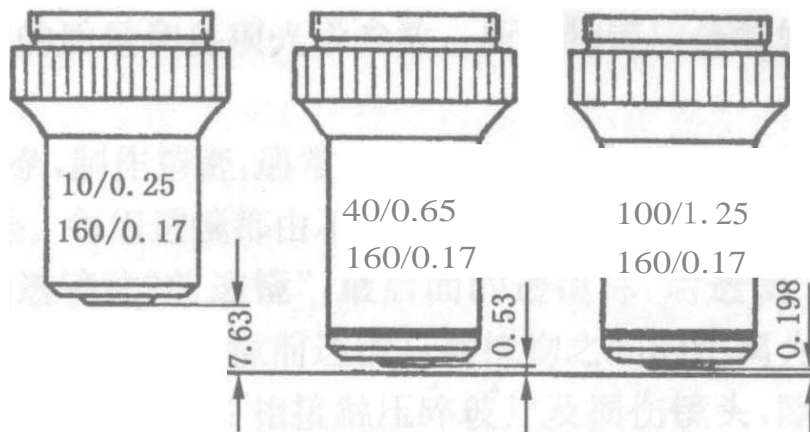
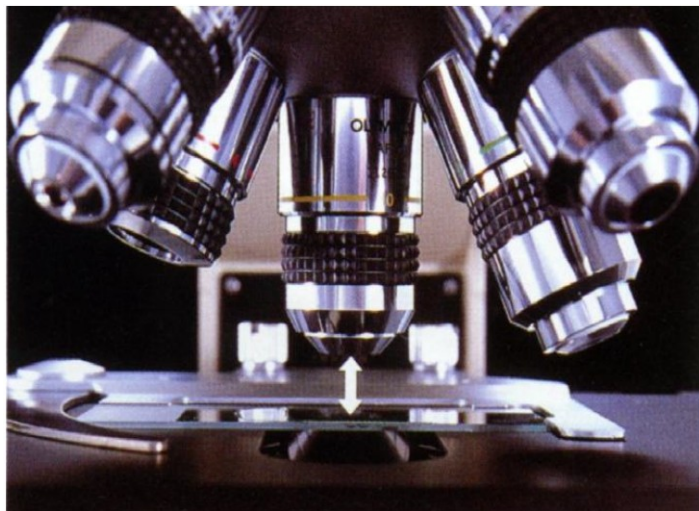
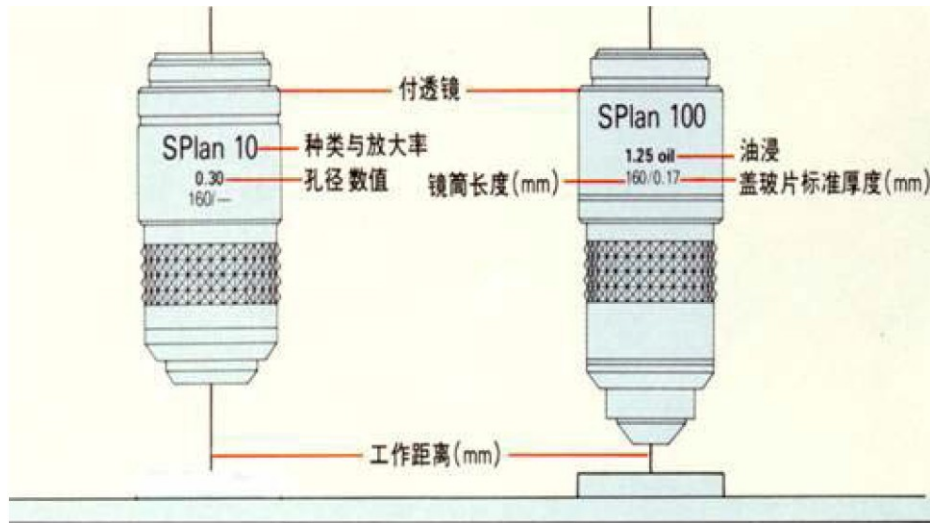
FN: 视场数 (Field Number, 简称为 FN)，标刻在目镜的镜筒外侧。

Mob: 物镜放大率。

由公式可看出：

- (1) 视场直径与视场数成正比。
- (2) 增大物镜的倍数，则视场直径减小。因此，若在低倍镜下可以看到被检物体的全貌，而换成高倍物镜，就只能看到被检物体的很小一部份。

6. (Work distance)



3-7

工作距离也叫物距，即指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离。镜检时，被检物体应处在物镜的一倍至二倍焦距之间。因此，它与焦距是两个概念，平时习惯所说的调焦，实际上是调节工作距离。在物镜数值孔径一定的情况下，工作距离短孔径角则大。数值孔径大的高倍物镜，其工作距离小。

7. 覆盖差

显微镜的光学系统也包括盖玻片在内。由于盖玻片的厚度不标准，光线从盖玻片进入空气产生折射后的光路发生了改变，从而产生了相差，这就是覆盖差。覆盖差的产生影响了显微镜的成相质量。国际上规定，盖玻片的标准厚度为 0.17mm，许可范围在 0.16—0.18mm，在物镜的制造上已将此厚度范围的相差计算在内。物镜外壳上标的 0.17，即表明该物镜要求盖玻片的厚度。

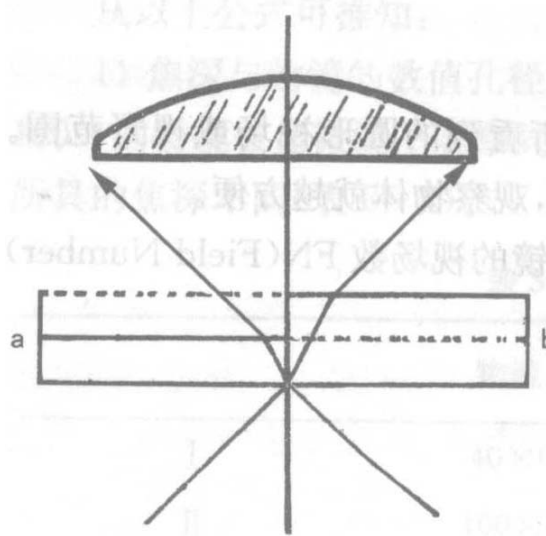


图 3-6 不同厚度盖玻片的覆盖差

a. 薄盖玻片；b. 厚盖玻片

第二章：关于物镜的区别

光学显微镜按照象差校正程度基本有如下 4 个：

- (1) 消色差(ACH):最基本,消除红蓝色差,但是不确保平场性,即视野内周边和中心不能同时清晰.
- (2) 平场消色差(PLAN ACH):即在 ACH 物镜基础上进行像场弯曲校正,确保整个视野内的同时清晰
- (3) 平场半复消色差(PLAN SEMI-APO):即在 PLAN ACH 物镜基础上对绿色色差进行了部分校正,基本接近复消色差物镜的水平
- (4) 平场复消色差(PLAN APO):最高档次物镜,对绿色色差进行了完全校正。

第三章：明场、暗场

1. 明视野观察 (Bright field)

明视野镜检是大家比较熟悉的一种镜检方式，广泛应用于病理、检验，用于观察被染色的切片，所有显微镜均能完成此功能。

2. 暗视野观察 (Dark field)

暗视野实际是暗场照明。它的特点和明视野不同，不直接观察到照明的光线，而观察到的是被检物体反射或衍射的光线。因此，视场成为黑暗的背景，而被检物体则呈现明亮的象。

暗视野的原理是根据光学上的丁道尔现象，微尘在强光直射通过的情况下，人眼不能观察，这是因为强光绕射造成的。若把光线斜射它，由于光的反射，微粒似乎增大了体积，为人眼可见。

暗视野观察所需要的特殊附件是暗视野聚光镜。它的特点是不让光束由下至上的通过被检物体，而是将光线改变途径，使其斜射向被检物体，使照明光线不直接进入物镜，利用被检物体表面反射或衍射光形成的明亮图象。暗视野观察的分辨率远高于明视野观察，最高达 $0.02\text{—}0.004\mu\text{m}$ 。

3. 相差镜检法 (Phase contrast)

在光学显微镜的发展过程中，相差镜检术的发明成功，是近代显微镜技术中的重要成就。我们知道，人眼只能区分光波的波长（颜色）和振幅（亮度），对于无色透明的生物标本，当光线通过时，波长和振幅变化不大，在明场观察时很难观察到标本。

相差显微镜利用被检物体的光程之差进行镜检，也就是有效地利用光的干涉现象，将人眼不可分辨的相位差变为可分辨的振幅差，即使是无色透明的物质也可成为清晰可见。这大大便利了活体细胞的观察，因此相差镜检法广泛应用于倒置显微镜。

4. 微分干涉称镜检术 (Differential interference contrast DIC)

微分干涉镜检术出现于 60 年代，它不仅能观察无色透明的物体，而且图象呈现出浮雕壮的立体感，并具有相衬镜检术所不能达到的某些优点，观察效果更为逼真。

5. 偏光显微镜 (Polarizing microscope)

偏光显微镜的应用：偏光显微镜是鉴定物质细微结构光学性质的一种显微镜。凡具有双折射的物质，在偏光显微镜下就能分辨的清楚，当然这些物质也可用染色发来进行观察，但有些则不可能，而必须利用偏光显微镜。

偏光显微镜的特点，就是将普通改变为偏光进行镜检的方法，以鉴别某一物质是单折射（各向同性）或双折射性（各向异性）。双折射性是晶体的基本特性。因此，偏光显微镜被广泛地应用在矿物，化学等领域。在生物学和植物学也有应用。

6. 浮雕相衬显微镜 (RC)

1975 年，Robert Hoffman 博士发明 2002 年，专利到期，各显微镜厂家纷纷推出采用以自己名义命名的 RC 技术产品。

原理：

斜射光照射到标本产生折射、衍射，光线通过物镜光密度梯度调节器产生不同阴影，从而使透明标本表面产生明暗差异，增加观察对比度

特点：

- ¾ 提高未染色标本的可见性和对比度；
- ¾ 图象显示阴影或近似三维结构而不会产生光晕；
- ¾ 可检测双折射物质(岩石切片、水晶、骨头) ；
- ¾ 可检测玻璃,塑料等培养皿中的细胞,器官和组织；
- ¾ 聚光镜的工作距离可以设计的更长；

¾ RC 物镜也可用于明场,暗场和荧光观察

(1) 荧光显微镜 (Fluorescence Microscopy) 荧光镜检术是用短波长的光线照射用

荧光素染色过的被检物体 ,使之受激发后而产生
长波长的荧光 , 然后观察。

优点 :

¾ 检出能力高 (放大作用)

¾ 对细胞的刺激小 (可以活体染色)

¾ 能进行多重染色

用途 :

¾ 物体构造的观察——荧光素

¾ 荧光的有无、色调比较进行物质判别——抗体荧光等

¾ 发荧光量的测定对物质定性、定量分析