普通高等教育“十二五”规划教材

显微观察与生物制片技术

张学舒　编著

中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

普通高等教育“十二五”规划教材

显微观察与生物制片技术

张学舒　编著

中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

内 容 提 要

本书主要介绍显微镜基本常识、显微镜的光学原理、显微镜系统组成与各种显微镜检技术，生物制片的目的、生物制片流程、生物制片使用的各类化学试剂与生物制片方法，包括显微观察技术、生物制片技术、显微观察与生物制片实验等三篇二十章。

本书从显微观察与生物制片的基本常识、概念出发，阐述了显微观察与生物制片的基本方法、特点；显微观察设备结构、组成与简单工作原理，不同显微镜检术应用领域、显微镜检附属用具的常规使用；阐述了生物制片工作的管理概念、要求与制度，生物制片的方式与方法，生物制片试剂的配制和使用，按流程介绍生物制片各环节的要领与步骤；用大量实例和图片介绍最常用的显微观察实验与生物制片实验。

本书着重于基础性与实践性，可作为高等院校生物学、农学、水产学及相关专业生物学实验课程的教材与实验指导书。

图书在版编目（CIP）数据

显微观察与生物制片技术 / 张学舒编著. -- 北京 : 中国水利水电出版社, 2012.9
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-5170-0194-2

Ⅰ. ①显… Ⅱ. ①张… Ⅲ. ①显微镜－高等学校－教材②切片（生物学）－制作－高等学校－教材 Ⅳ. ①TH742②Q-336

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第224972号

书　名	普通高等教育“十二五”规划教材 **显微观察与生物制片技术**
作　者	张学舒　编著
出版发行	中国水利水电出版社 （北京市海淀区玉渊潭南路1号D座　100038） 网址：www.waterpub.com.cn E-mail：sales@waterpub.com.cn 电话：（010）68367658（发行部）
经　售	北京科水图书销售中心（零售） 电话：（010）88383994、63202643、68545874 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排　版	中国水利水电出版社微机排版中心
印　刷	三河市鑫金马印装有限公司
规　格	184mm×260mm　16开本　11.5印张　273千字
版　次	2012年9月第1版　2012年9月第1次印刷
印　数	0001—3000册
定　价	**25.00**元

凡购买我社图书，如有缺页、倒页、脱页的，本社发行部负责调换

版权所有　侵权必究

前 言

在人类对微观世界的认知中，显微镜是这种活动的主要工具，而生物制片技术是显微观察得以实现的手段。没有显微镜的发明和发展，就不可能有现代科学许多领域的发展。只有在复式显微镜发明以后，人们才能够看到过去用肉眼所无法看到的动植物体和微生物的细微结构以及各种各样的微小物体。

作为精密的光学仪器，显微放大技术已有300多年的发展史。在生物学的形态特征、组织结构、组织化学、机体功能等许多研究领域中，显微观察有着不可替代的作用。它也广泛应用于现代科学技术和生产的各个领域，是一种十分重要的观测工具。特别是在生物学、医学、农业、畜牧、地质、矿产和一些工业部门内，显微镜具有特殊的地位，发挥着非常重要的作用。随着显微镜不断改进，一些科学领域才得以不断发展，特别是在16～18世纪，生物学和医学的每一项重大的发现几乎都是由显微镜的一次重要的改进所引起的，而且在微观科学领域内做出某些重大发现的就是一些眼镜商、镜片密制者或显微镜制造者。被恩格斯称为19世纪自然科学三大发现之一的细胞学说的创立就与显微镜的应用是分不开的。

在现代科学技术中，光学显微镜是一种使用很普遍的基本观测仪器，由于显微镜制造技术的飞速发展，它的应用范围变得愈来愈广，除了使用一般明视野透射光以外，还可以使用暗视野、相差、偏光、荧光、紫外光、红外光进行标本的观察。除进行细微结构的观察而外，还可以进行照相、描绘、投影放大，以及对微小物体的长度、面积和体积的测量。同时，由于显微镜同电影、电视、分光光度术等现代技术的结合，出现了显微电影摄影机、电视显微镜、自动影像分析仪、显微分光光度计、流式细胞分光光度计等大型自动影像记录和测量分析仪器，不仅可以真实地记录活体生物中微观的运动和变化，而且可以通过分析表现生物的功能数据。

在人们对生物材料进行显微观察的进程中，摸索、借鉴、引用和创新了许多将生物对象制作成可适用于显微镜下观察的方法——生物制片技术。生物制片技术的宗旨是尽可能将生物材料原态清晰地呈现在显微观察的视野中，

这种呈现通过对生物材料进行固定、切片、铺展、离散、染色、封藏等处理方式得以进行。生物制片是对生物材料进行理化处理的综合过程，需要实施者不仅要掌握生物学知识，而且要具有较高的物理、化学水平。现代科技的发展使得生物制片的许多过程可以用自动化或半自动化的仪器来完成。研发出了诸如自动脱水机、全自动包埋机、自动切片机等仪器设备，提高了生物制片的效率和完整性。

本书分三篇二十章，简明系统地介绍了显微观察技术和生物制片技术。第一篇显微观察技术，主要介绍显微观察的原理、显微镜的光学系统和机械系统、各种显微镜检术。第二篇生物制片技术，主要介绍生物制片流程各环节的要领、使用的化学药剂和仪器设备、制片流程的时序安排。第三篇显微观察与生物制片实验，实例讲解（附操作图片）显微观察和生物制片的各类实验要求、实验器材、实验进程和实验结果。

本书一直作为浙江海洋学院水产实验教学中心的指定教材，在编写、使用、修订和出版过程中得到该单位的大力支持，谨此致以诚挚的感谢。

限于编者水平，不足之处在所难免，敬请读者提出宝贵意见。

编者

2012 年 7 月

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

目 录

前言

第一篇 显微观察技术 …… 1

第一章 显微观察概述 …… 1

第一节 显微镜的发明与沿革 …… 1

第二节 显微镜的种类 …… 2

第二章 显微镜的光学原理及光学部件 …… 4

第一节 显微镜的成像（几何成像）原理 …… 4

第二节 显微成像的影响因素 …… 5

第三节 显微镜的光学技术参数 …… 7

第四节 物镜 …… 9

第五节 目镜 …… 11

第六节 集光镜 …… 13

第七节 显微镜的照明装置 …… 17

第三章 显微镜的结构与使用 …… 19

第一节 显微镜的机械装置 …… 19

第二节 显微镜的使用 …… 22

第四章 显微镜的附属用具 …… 27

第一节 显微量尺 …… 27

第二节 血球计数板 …… 31

第五章 各种显微镜检术介绍 …… 33

第一节 明视野显微观察 …… 33

第二节 暗视野显微观察 …… 33

第三节 相差镜检法 …… 34

第四节 微分干涉差镜检法 …… 35

第五节 荧光镜检法 …… 36

第六节 偏光镜检法 …… 37

第七节 倒置式显微观察 …… 38

第八节 体视显微镜 …… 39

第六章 显微影像 …… 42

第一节　显微摄影 …… 43
第二节　洗印和放大 …… 49
第三节　显微摄像系统 …… 52

第二篇　生物制片技术 …… 56
第七章　一般准备 …… 56
第一节　实验室守则 …… 56
第二节　玻璃器皿的清洁 …… 57
第三节　溶液的配制 …… 57
第四节　实验计划 …… 59
第五节　日程与记录 …… 59
第八章　一般方法概述 …… 61
第一节　切片法 …… 61
第二节　非切片法 …… 62
第九章　材料的采集、分割与麻醉 …… 64
第一节　植物材料的采集与分割 …… 64
第二节　动物的麻醉与材料的割取 …… 66
第十章　固定与固定液 …… 67
第一节　固定的目的与性质 …… 67
第二节　固定液的种类与性能 …… 67
第三节　固定液的作用与选择 …… 79
第四节　固定时的注意事项 …… 82
第十一章　冲洗、脱水与透明 …… 83
第一节　冲洗 …… 83
第二节　脱水 …… 83
第三节　透明 …… 86
第四节　药品的回收与再利用 …… 89
第十二章　透入与包埋 …… 90
第一节　透入 …… 90
第二节　包埋 …… 92
第十三章　切片与贴片 …… 95
第一节　切片 …… 95
第二节　贴片 …… 104
第十四章　染料与染色 …… 107
第一节　染料 …… 107
第二节　染色 …… 112
第十五章　封藏 …… 124
第一节　封藏剂 …… 124

第二节　封藏法 …… 125
第三篇　显微观察与生物制片实验 …… 127
第十六章　显微观察技术实验 …… 127
第一节　油浸系物镜的使用方法 …… 127
第二节　显微测量的方法 …… 130
第三节　显微计数的方法 …… 134
第十七章　切片式生物制片 …… 138
第一节　徒手切片法 …… 138
第二节　冰冻切片法 …… 141
第三节　石蜡切片法 …… 145
第十八章　整体式生物制片 …… 156
第一节　暂时和半永久性制片法 …… 156
第二节　永久性整体制片法 …… 157
第十九章　铺展式生物制片 …… 159
第一节　铺片法 …… 159
第二节　涂布法 …… 161
第三节　压碎法 …… 164
第二十章　离散式生物制片 …… 170
第一节　植物材料解离法 …… 170
第二节　动物材料解离法与梳离法 …… 173
参考文献 …… 174

第一篇　显微观察技术

第一章　显微观察概述

第一节　显微镜的发明与沿革

很早以前，人们就知道某些光学装置能够“放大”物体。比如在《墨经》里面就记载了能放大物体的凹面镜。至于凸透镜是什么时候发明的，可能已经无法考证。凸透镜有的时候人们把它称为“放大镜”——能够聚焦太阳光，也能让你看到放大后的物体，这是因为凸透镜能够把光线偏折。通过凸透镜看到的其实是一种幻觉，严格地说叫虚像。当物体发出的光通过凸透镜的时候，光线会以特定的方式偏折。当我们看到那些光线的时候，不自觉地认为它们仍然是沿笔直的路线传播，结果物体就会看上去比原来大。

单个凸透镜能够把物体放大几十倍，这远远不足以让我们看清某些物体的细节。13 世纪，出现了为视力不济的人准备的眼镜——一种玻璃制造的透镜片。大约在 16 世纪末，荷兰的眼镜商詹森（Zaccharias Janssen）和他的儿子把几块镜片放进了一个圆筒中，结果发现通过圆筒看到附近的物体出奇的大，这就是现在的显微镜（microscope）和望远镜的前身。

詹森制造的是第一台复合式显微镜。使用两个凸透镜，一个凸透镜把另外一个所成的像进一步放大，这就是复合式显微镜的基本原理。如果两个凸透镜一个能放大 10 倍，另一个能放大 20 倍，那么整个镜片组合的放大倍数就是 $10\times20=200$ 倍。詹森时代的复合式显微镜并没有真正显示出它的威力，它们的放大倍数低得可怜。荷兰人安东尼·冯·列文虎克（Anthony von Leeuwenhoek，1632—1723）制造的显微镜让人们大开眼界。列文虎克自幼学习磨制眼镜片的技术，热衷于制造显微镜。他制造的显微镜其实就是一片凸透镜，而不是复合式显微镜。不过，由于他的技艺精湛，磨制的单片显微镜的放大倍数将近 300 倍，超过了以往任何一种显微镜。

当列文虎克把他的显微镜对准一滴雨水的时候，他惊奇地发现了其中令人惊叹的小小世界：无数的微生物游弋于其中。他把这个发现报告给了英国皇家学会，引起了一阵轰动。人们有时候把列文虎克称为“显微镜之父”，严格地说这不太正确。列文虎克没有发明第一个复合式显微镜，他的成就只是制造出了高质量的凸透镜镜头。

在接下来的两个世纪中，复合式显微镜得到了充分的完善。例如人们发明了能够消除色差（当不同波长的光线通过透镜的时候，它们折射的方向略有不同，这导致了成像质量的下降）和其他光学误差的透镜组。与 19 世纪的显微镜相比，现在我们使用的普通光学

显微镜基本上没有什么改进。原因很简单：光学显微镜已经达到了分辨率的极限。

如果仅仅在纸上画图，自然能够“制造”出任意放大倍数的显微镜。但是，光的波动性将毁掉完美的发明。即使消除掉透镜形状的缺陷，任何光学仪器仍然无法完美地成像。人们花了很长时间才发现，光在通过显微镜的时候要发生衍射。简单来说，物体上的一个点在成像的时候不会是一个点，而是一个衍射光斑；如果两个衍射光斑靠得太近，你就没法把它们分辨开来；显微镜的放大倍数再高也无济于事了。对于使用可见光作为光源的显微镜，它的分辨率极限是 0.2μm。任何小于 0.2μm 的结构都没法识别出来。提高显微镜分辨率的途径之一就是设法减小光的波长，或者用电子束来代替光。根据德布罗意（1892—1987）的物质波理论，运动的电子具有波动性，而且速度越快，它的“波长”就越短。如果能把电子的速度加到足够高，并且汇聚它，就有可能用来放大物体。

1938 年，德国工程师 Max Knoll 和 Ernst Ruska 制造出了世界上第一台透射电子显微镜（TEM）。1952 年，英国工程师 Charles Oatley 制造出了第一台扫描电子显微镜（SEM）。电子显微镜是 20 世纪最重要的发明之一。由于电子的速度可以加到很高，电子显微镜的分辨率可以达到纳米级（10^{-9}m）。很多在可见光下看不见的物体，例如病毒在电子显微镜下现出了原形。

用电子代替光或许是一个反常规的主意，但是还有更令人吃惊的。1983 年，IBM 公司苏黎世实验室的两位科学家发明了所谓的扫描隧道显微镜（STM）。这种显微镜比电子显微镜更激进，它完全失去了传统显微镜的概念。

很显然，你不能直接“看到”原子。因为原子与宏观物质不同，它不是光滑的、滴溜乱转的削球，更不是达·芬奇绘画时候所用的模型。扫描隧道显微镜依靠所谓的“隧道效应”工作。如果舍弃复杂的公式和术语，这个工作原理其实很容易理解。隧道扫描显微镜没有镜头，它使用一根探针。在探针和物体之间加上电压，如果探针距离物体表面很近，大约在纳米级的距离上，隧道效应就会起作用。电子会穿过物体与探针之间的空隙，形成一股微弱的电流。如果探针与物体的距离发生变化，这股电流也会相应地改变。这样，通过测量电流就能知道物体表面的形状，分辨率可以达到单个原子的级别。

第二节　显 微 镜 的 种 类

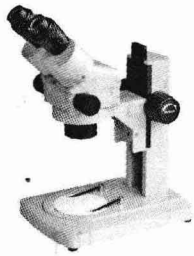
显微镜的种类很多，一般可分为光学显微镜与非光学显微镜两大类。光学显微镜又可分为单式显微镜与复式显微镜。非光学显微镜为电子显微镜。本书主要介绍常用的光学显微镜。

一、单式显微镜

最简单的单式显微镜，即普通常称的放大镜，其放大倍数常在 10 倍以下，由一个凸透镜构成。构造复杂的单式显微镜为解剖显微镜，其放大倍数在 200 倍以下，由几个凸透镜组成，如图 1－1 所示。

放大镜的放大原理如图 1－2 所示。若将物体置于凸透镜与焦点 F 之间，则从物体过来的光线，通过透镜后，将在相反方向（物体的同一边）造成一个放大而直立的虚像。若眼睛在 F'处观察，即可看到这个放大虚像，如图 1－2 所示。

(a)



(b)

图 1-1　单式显微镜

(a) 放大镜；(b) 解剖显微镜

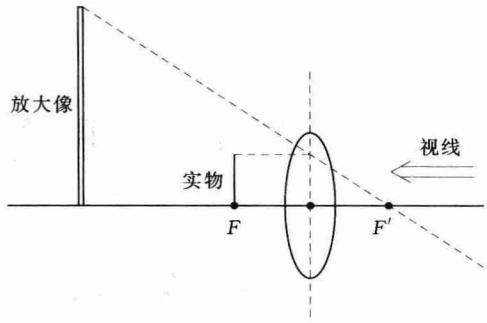


图 1-2　放大镜成像示意图

二、复式显微镜

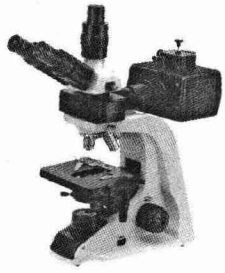
复式显微镜是实验室中常用的显微镜，结构较复杂，放大倍数也高，由两组以上的透镜构成。复式显微镜虽然类型很多，但是它们的主要部分是一致的，包括物镜、目镜和聚光器等光学系统。

复式显微镜的成像：物体置在集光器与物镜之间，平行的光线自反射镜折入集光器，光线经过集光器穿过透明的物体进入物镜后，即在目镜的焦点平面（光阑部位或在它的附近）形成了一个初生倒置的实像。从初生实像射过来的光线，经过目镜的接目透镜而到达眼球。这时的光线已成平行或接近平行。这些平行光线透过眼球的水晶体就在网膜上形成了一个直立的实像。这样眼球就成为显微镜系统的一个组成部分了。这时，在显微镜中所看到的是放大了的倒置的虚像，和视网膜上所造成的实像是吻合的。

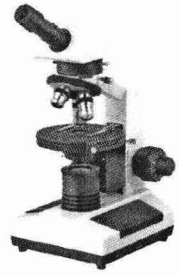
从眼球的水晶体到放大的虚像之间的距离称为明视距离。它的长度为 250mm，这是观察显微镜中物像最适宜的距离。从镜筒的抽管上升到物镜螺旋基部之间的长度，就是机械筒长（mechanical tube length）。它的一般长度为 160mm，也有的长 170mm。由物镜的上焦平面到目镜的下焦平面之间的距离为光学筒长（optical tube length）。其长度随机械筒长及物镜不同而改变。

复式显微镜的种类很多，除一般常用的明视野显微镜外，尚有几种性能各不相同的显微镜，如暗视野显微镜、相差显微镜、偏光显微镜、紫外光显微镜和荧光显微镜等，如图 1-3 所示。详见第五章。

(a)



(b)



(c)

(d)

图 1-3　不同类型的复式显微镜

(a) 简易显微镜；(b) 荧光显微镜；(c) 偏光显微镜；(d) 微分干涉差显微镜

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

第二章　显微镜的光学原理及光学部件

第一节　显微镜的成像（几何成像）原理

显微镜之所以能将被检物体进行放大，是通过透镜来实现的。单透镜成像具有像差，严重影响成像质量，因此显微镜的主要光学部件都由透镜组合而成。从透镜的性能可知，只有凸透镜才能起放大作用，而凹透镜不行。显微镜的物镜与目镜虽都由透镜组合而成，但相当于一个凸透镜。为便于了解显微镜的放大原理，简要说明一下凸透镜的 5 种成像规律：

（1）当物体位于透镜物方 2 倍焦距以外时，则在像方 2 倍焦距以内、焦点以外形成缩小的倒立实像。

（2）当物体位于透镜物方 2 倍焦距上时，则在像方 2 倍焦距上形成同样大小的倒立实像。

（3）当物体位于透镜物方 2 倍焦距以内、焦点以外时，则在像方 2 倍焦距以外形成放大的倒立实像。

（4）当物体位于透镜物方焦点上时，则像方不能成像。

（5）当物体位于透镜物方焦点以内时，则像方也无像的形成，而在透镜物方的同侧比物体远的位置形成放大的直立虚像。

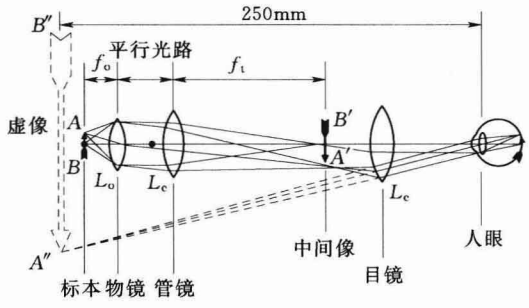


图 2－1　复式显微镜的成像光路

显微镜的成像原理就是利用上述（3）和（5）的规律把物体放大的。当物体处在物镜前 $F\sim2F$（F 为物方焦距）时，则在物镜像方的二倍焦距以外形成放大的倒立实像。在显微镜的设计上，将此像落在目镜的一倍焦距 F_1 之内，使物镜所放大的第一次像（中间像）又被目镜再一次放大，最终在目镜的物方（中间像的同侧）、人眼的明视距离（250mm）处形成放大的直立（相对中间像而言）虚像。因此，当我们在镜检时，通过目镜（不另加转换棱镜）看到的像与原物体的像方向相反，如图 2－1 所示。

$$M_o = f_t / f_o$$

式中：M_o 为物镜放大倍数；f_t 为管镜焦距；f_o 为物镜焦距。

传统的光学显微镜主要由光学系统及支撑它们的机械结构组成，光学系统是由各种

光学玻璃做成的复杂化了的放大镜。物镜将标本放大成像，其放大倍率 $M_{物}$ 由下式决定：

$$M_{物}=\Delta/f'_{物}$$

式中：$f'_{物}$ 为物镜的焦距；Δ 为物镜与目镜间的距离。

目镜将物镜所成之像再次放大，成一个虚像在人眼前 250mm 处供人观察，这是多数人感觉最舒适的观察位置，目镜的倍率：

$$M_{目}=250/f'_{目}$$

式中：$f'_{目}$ 为目镜的焦距。

显微镜的总放大倍率是物镜与目镜的乘积：

$$M_{总}=M_{物}\times M_{目}=\frac{\Delta\times 250}{f'_{目}\times f_{物}}$$

可见，减小物镜及目镜焦距将使总放大倍率提高，这是用显微镜可以看到细菌等微生物的关键，也是其与普通放大镜的区别所在。

复式显微镜的主要功能部分是光学系统，包括物镜、目镜、聚（集）光镜和光源几部分，如图 2-2 所示。

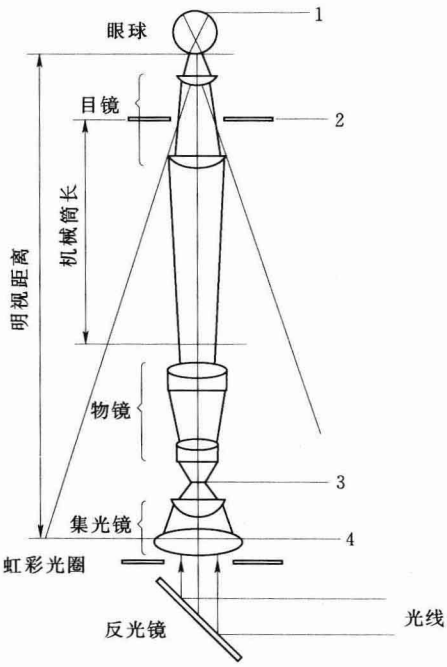


图 2-2　复式显微镜的成像示意图

1—视网膜上直立的实像；2—最初倒置的实像；3—直立的物体（标本）；4—最后在视野中看到的倒置的虚像

第二节　显微成像的影响因素

一、折射和折射率

光线在均匀的各向同性介质中，两点之间以直线传播；当通过不同密度介质的透明物体时，则发生折射现象，这是由于光在不同介质中的传播速度不同造成的。当与透明物面不垂直的光线由空气射入透明物体（如玻璃）时，光线在其界面改变了方向，并和法线构成折射角。

二、透镜的性能

透镜是组成显微镜光学系统的最基本的光学元件，物镜、目镜和集光镜等部件均由单个或多个透镜组成。透镜依其外形的不同，可分为凸透镜（正透镜）和凹透镜（负透镜）两大类。

当一束平行于光轴的光线通过凸透镜后相交于一点，这个点称“焦点”，通过交点并垂直光轴的平面称“焦平面”。焦点有两个，在物方空间的焦点称“物方焦点”，该处的焦平面称“物方焦平面”；反之，在像方空间的焦点称“像方焦点”，该处的焦平面称“像方焦平面”。

光线通过凹透镜后成正立虚像，而凸透镜则成正立实像；实像可在屏幕上显现出来，

而虚像则不能。

三、像差

由于客观条件，任何光学系统都不能生成理论上理想的像，各种像差的存在影响了成像质量。下面分别简要介绍各种像差。

1. 色像差（chromatic aberration）

色差是透镜成像的一个严重缺陷，发生在多色光为光源的情况下；单色光不产生色差。白光由红橙黄绿青蓝紫7种组成，各种光的波长不同，所以在通过透镜时的折射率也不同，这样物方一个点在像方则可能形成一个色斑。

光线通过一个透镜后，不能使所有颜色的光线都聚在一个焦点上，而是参差不齐的，如图2-3所示。造成这种现象的原因是，各种颜色的光线波长不同，通过双凸透镜后它们的屈折角度也不一样，因而造成了各种不同的焦点。通常红光造成的焦点离透镜最远，紫光造成的焦点离透镜最近。所造成的像不清晰，成为一个由五彩圆环所组成的小圈（红色在中心）。这种现象称为色像差。

色差一般有位置色差、放大率色差。位置色差使像在任何位置观察都带有色斑或晕环，使像模糊不清。而放大率色差则使像带有彩色边缘。

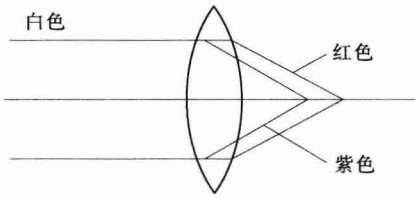


图2-3　单透镜的色像差

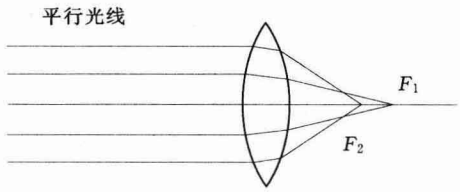


图2-4　单透镜的球面像差

2. 球面像差（spherical aberration）

球面像差简称球差。透射于透镜边缘的光线的屈折度大于中央部的，因此造成的焦点有参差，不在同一点上，如图2-4所示；这样一来，就使造成的像不明晰，而且还能使它变形，这就是球差。球差造成的结果是，一个点成像后，不再是个亮点，而是一个中间亮、边缘逐渐模糊的亮斑。

球差的矫正常利用透镜组合来消除。由于凸、凹透镜的球差是相反的，可选配不同材料的凸、凹透镜胶合起来给予消除。旧型号显微镜，物镜的球差没有完全矫正，应与相应的补偿目镜配合，才能达到纠正效果；一般新型显微镜的球差完全由物镜消除。

3. 慧差（coma）

慧差属轴外点的单色相差。轴外物点以大孔径光束成像时，发出的光束通过透镜后不再相交一点，则一光点的像便会得到一逗点状，形如慧星，故称慧差。

4. 像散（astigmatism）

像散也是影响清晰度的轴外点单色相差。当视场很大时，边缘上的物点离光轴远，光束倾斜大，经透镜后则引起像散。像散使原来的物点在成像后变成两个分离并且相互垂直的短线，在理想像平面上综合后，形成一个椭圆形的斑点。像散是通过复杂的透镜组合来消除的。

5. 场曲（curvature of field）

场曲又称“像场弯曲”。当透镜存在场曲时，整个光束的交点不与理想像点重合，虽然在每个特定点都能得到清晰的像点，但整个像平面则是一个曲面。这样一来，在镜检时不能同时看清整个像面，给观察和照相造成困难。因此研究用显微镜的物镜一般都是平场物镜，这种物镜已经矫正了场曲。

6. 畸变（distortion）

前面所说各种像差，除场曲外都影响像的清晰度。畸变是另一种性质的像差，光束的同心性不受到破坏，因此不影响像的清晰度；但是，使像与原物体比，在形状上造成失真。

第三节　显微镜的光学技术参数

显微镜的光学技术参数包括数值孔径、分辨率、放大率、焦深、视场直径、覆盖差、工作距离等。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，N. A.）

数值孔径是物镜和集光镜的主要技术参数，是判断两者（尤其对物镜而言）性能高低的重要标志。其数值的大小，分别标刻在物镜和集光镜的外壳上。

数值孔径（N. A.）是物镜前透镜与被检物体之间介质的折射率（n）和孔径角（a）半数的正弦的乘积。公式表示如下：

$$\text{N. A.} = n \cdot \sin(a/2)$$

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。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。

显微镜观察时，若想增大 N. A 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系物镜，因介质的折射率 n 值大于 1，N. A. 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 N. A. 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，在观察时集光镜的 N. A. 值应等于或略大于物镜的 N. A. 值。

数值孔径与其他技术参数有着密切的关系，它几乎决定和影响着其他各项技术参数。数值孔径与分辨率成正比，与放大率成正比，与焦深成反比；数值孔径增大，视场直径与工作距离都会相应地变小。

2. 分辨率（resolution）

分辨率又称“鉴别率”和“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：

$$d = \lambda / \text{N. A.}$$

式中：d 为最小分辨距离；λ 为光线的波长；N. A. 为物镜的数值孔径。

可见物镜的分辨率是由物镜的 N. A. 值与照明光源的波长两个因素决定。N. A. 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）降低光源波长 λ 值，使用短波长的。

（2）增大介质 n 值和提高 N. A. 值。

（3）增大孔径角。

（4）增加明暗反差。

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像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。但是，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。

4. 焦深（depth of field）

焦深为焦点深度的简称。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、物镜的数值孔径成反比。

（2）焦深大，分辨率降低。

由于低倍物镜的焦深较大，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称视场，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。视场直径越大，越便于观察。公式表示如下：

$$F=FN/M_{ob}$$

式中：F 为视场直径；FN 为视场数；M_{ob} 为物镜放大率。

视场数（field number，FN）是目镜线视场的大小（单位：mm）。它等于目镜的视场光阑的直径（视场光阑位于场镜前）或视场光阑被场镜所成像的直径（视场光阑位于场镜后）。数值标刻在目镜的镜筒外侧。

由公式可看出：

（1）视场直径与视场数成正比。

（2）增大物镜放大率，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，而换成高倍物镜后就只能看到被检物体的很小一部分了。

6. 覆盖差（cover poor）

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像质量。

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。如果物镜外壳上标示 0.17，即表明它是该物镜要求盖玻片的厚度。

7. 工作距离（working distance，WD）

工作距离也称物距，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 1 倍至 2 倍焦距之间。因此，工作距离与焦距是两个概念。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，工作距离短则孔径角大。数值孔径大的高倍物镜，其工作距离小。

第四节　物　　镜

一、物镜的性质

1. 放大倍数

物镜（图 2－5）的放大倍数都在物镜头上注明，从 3×（倍）到 100×。常用的低倍镜的放大倍数为 10×，高倍镜的为 40×，油镜的为 100×。放大倍数在 6×以下或 100×以上的，用处不大。放大倍数计算的方法如下式：

物镜的放大倍数＝相当的光学筒长/物镜的焦距

式中：光学筒长＝物镜上焦点平面到目镜下焦点平面间的距离。

例如，物镜的焦距为 16mm 时，常与 160mm 的光学筒长一起使用，这样它的放大倍数为 160/16＝10。

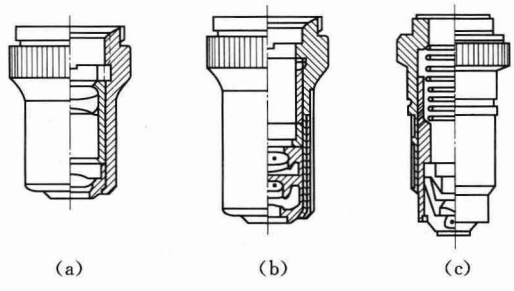


图 2－5　物镜

（a）低倍物镜；（b）高倍物镜；（c）弹簧物镜

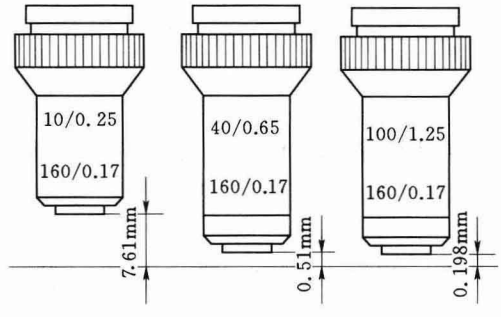


图 2－6　不同放大倍数物镜的工作距离

2. 工作距离

工作距离是指物镜最下面透镜的表面与盖玻片（其厚度为 0.17～0.18mm）上表面之间的距离。物镜的放大倍数越大，它的工作距离越小（图 2－6）。一般油镜的工作距离为 0.2mm，盖玻片的厚度若为 0.17～0.18mm，则在观察时毫无妨碍；若盖玻片过厚，就不

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com