

第一章 医用光学显微镜的使用技术

学习要点

- ◆ 显微镜的成像原理
- ◆ 显微镜的性能指标
- ◆ 医用显微镜的基本构造
- ◆ 显微镜光学系统的清洁与使用
- ◆ 显微摄影术的测光与曝光

显微镜(microscope)是用于观察微小物体的仪器，至今已经有 300 多年的历史。在医学检验方面，显微镜主要用来观察骨髓细胞、血液细胞、脱落细胞、寄生虫和微生物，也广泛用于人体组织细胞和病理细胞的观察、科学研究以及显微外科手术等其他医学领域。

显微镜的种类很多，分类方法也不尽相同。

按照显微镜原理和结构的不同，可将其分为光学显微镜、非光学显微镜和光电结合显微镜三种类型。光学显微镜的主要特征是由光学透镜制成，如用于医学检验领域的医用光学显微镜；非光学显微镜是用电子技术制成，如电子显微镜；光电结合显微镜是光学技术和电子技术相结合的产物，如摄像显微镜、电视显微镜等。

根据显微镜的用途不同，又可将其分为普通型、特种型和高级型三大类。

普通型显微镜用于一般的形态观察和研究。

特种型显微镜是在特定条件下使用的显微镜，如用于观察细菌和螺旋体运动的暗视场显微镜，用于细胞培养、组织培养和微生物的研究的倒置显微镜，用于观察无色透明标本的相衬显微镜，用于观察标本发出荧光的荧光显微镜，用于观察物体立体成像的立体显微镜以及可观察投影屏上物像投影的投影显微镜等。

高级型显微镜主要用于科学研究领域，如万能显微镜，变换附件后除能满足普通用途外，还可以满足上述诸多特殊用途。

本章主要介绍医用光学显微镜的成像原理与性能、使用方法与维护以及几种常用的特殊显微镜，其次介绍显微镜的机械系统和显微摄影技术。

第一节 显微镜的成像原理与性能

我们可以简单地把显微镜看作由两块凸透镜组成，靠近被观察物体的一块叫做物镜，靠近眼睛的一块叫做目镜。实际上，显微镜的物镜和目镜都是由多块透镜组成的复杂的透镜组。为了

便于理解，将显微镜的成像原理简明叙述如下。

一、原理

将被观察物体 AB 放在物镜焦距以外靠近焦点的地方，在物镜的另一侧就生成一个放大、倒立的实像 $A'B'$ 。这个实像正好落在目镜的焦距之内，经目镜将其再一次放大后，我们在目镜中看到的则是一个倒立（对原物而言）的虚像 $A''B''$ 。由此可见，物体经光学系统做了两次放大（图 1-1）。

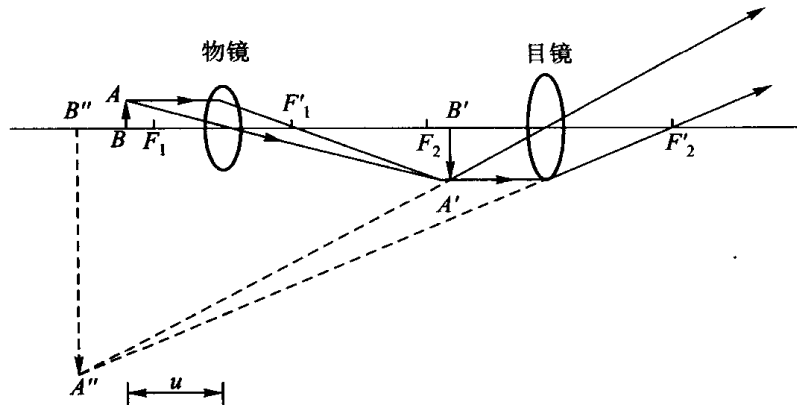


图 1-1 显微镜光学原理示意图

AB 为被观察物体； $A'B'$ 为物镜放大后的 AB 倒立实像； $A''B''$ 为目镜再次放大后的 AB 倒立虚像； u 为物体到透镜间的距离； F 为透镜的焦距； F_1 为物镜前焦距； F'_1 为物镜后焦距； F_2 为目镜前焦距； F'_2 为目镜后焦距

由透镜的成像原理我们知道，当 $2F > u > F$ 时，成倒立放大的实像，当 $u < F$ 时，成正立放大的虚像。

二、性能指标

要想在镜检时看到反差适度、清晰明了的理想图像，必须充分利用显微镜的各项性能指标，并根据实际情况来调试显微镜各参数指标，以得到理想的镜检效果。

光学显微镜主要的技术参数指标包括数值孔径、分辨率、放大率、焦点深度、视场宽度、覆盖差、工作距离和图像亮度与视场亮度等。它们彼此之间既相互联系又相互制约，每个参数都有其自身的合理界限。

（一）数值孔径 (numerical aperture, NA)

数值孔径也称“镜口率”或“开口率”，它是指被检物体与物镜之间介质的折射率，简称 NA 值或 A 值。即：

$$NA = \eta \cdot \sin(u/2)$$

式中： η 为折射率； u 为物镜镜口角。

镜口角（孔径角）是指物镜光轴上的物体点与物镜前透镜所形成的角度。孔径角越大，物镜的光通量就越高（图 1-2）。

数值孔径与显微镜的其他各个光学参数都有密切关系，一般希望它越大越好。从公式中可知，提高数值孔径有两种

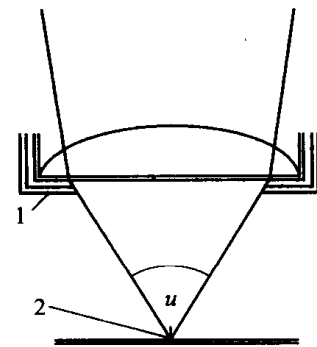


图 1-2 显微镜的镜口角示意图

1. 物镜 2. 标本 u . 镜口角

方法，一是增大镜口角，二是增大物镜与标本之间的折射率。

采取前一种方法时，可以让标本与物镜尽量靠近。但无论怎样靠近， u 总是小于 180° 。这样 $\sin(u/2)$ 也小于1。而空气的折射率 $\eta=1$ 。因此，干燥系物镜的数值孔径总是小于1，一般在 $0.04 \sim 0.951$ 之间。

采取后一种方法时，可在物镜与标本之间加入折射率较大的介质，如香柏油($\eta=1.515$)。使用香柏油为介质时，可使数值孔径达到1.2以上，这是为什么要使用油镜的原因。目前油镜所能达到的最大数值孔径为1.4。

数值孔径不仅是物镜和聚光器的最主要的技术参数之一，同时也是判断两者性能高低的最为重要的指标。数值孔径的大小直接影响到显微镜的观察和拍摄效果，通常直接标刻在显微镜的物镜和聚光器的外表面。

(二) 分辨率(resolving power)

分辨率也叫“分辨力”或“解像力”。它是衡量显微镜性能的又一个重要技术参数。

分辨率是指显微镜分辨被检物体细微结构的能力，它与分辨距离成反比。分辨距离是指能被分辨开的两物点间的最小距离。分辨距离越小，显微镜的分辨率越高。如果两物点间的距离小于分辨距离，就会把两点误看成一点，无法看清其结构。分辨率是由物镜决定的。目镜只起放大作用，并不增加显微镜的分辨率。

分辨率可用公式表示为

$$\delta = \lambda / NA$$

式中 δ 表示最小分辨距离，单位为微米(μm)； λ 表示照明光线的波长，单位为微米； NA 表示物镜的数值孔径。

在可见光中，亮度最大而且对人眼最敏感的波长 λ 为 $0.55 \mu\text{m}$ ，当物镜的 NA 为1.4时，则 $\delta = 0.55/1.4 = 0.39 \mu\text{m}$ ，所以该物镜的分辨能力约为 $0.4 \mu\text{m}$ 。换句话说，本物镜能分辨出 $0.4 \mu\text{m}$ 以上的物体点。在可见光照明的情况下，普通光学显微镜分辨距离的极限为 $0.2 \mu\text{m}$ ，而距离小于 $0.2 \mu\text{m}$ 的两物体用普通光学显微镜则无法区分。

要想在一定范围内增加分辨率，可在以下三个方面采取措施：

1. 尽量使用折射率较高的镜油作介质，提高 NA 值。这种方法可有效地增加显微镜的分辨率。
2. 在光源处加蓝色或蓝紫色滤光片，使波长缩短，可有效提高显微镜的分辨率。如使用紫外光作光源，也可将光源的波长变成 275 nm ($0.275 \mu\text{m}$)的单色光，从而使 δ 值减小到 $0.22 \mu\text{m}$ 。
3. 镜检时，增加明暗反差也是提高清晰度的一项有力措施。可用适当调节孔径光阑的方法来达到增强反差的目的。

电子流的波长只有 0.00387 nm 。利用“电子透镜”或磁透镜来控制电子流，所制成的电子显微镜的分辨距离可达零点几纳米(nm)，以用来观察原子的结构。

常用介质的折射率见表1-1。不同波长所能取得的分辨率见表1-2。

表 1-1 常用介质折射率一览表

名 称	折射率 η
空气	1(极接近 1)
水	1.33
蒸馏水	1.336
等量甘油 + 水	1.397
甘油	1.405
液状石蜡	1.471
二甲苯	1.492
油浸镜头油(香柏油)	1.515
加拿大树胶	1.51 ~ 1.535
石英	1.544
火石玻璃(铅玻璃)	1.56
一溴化萘	1.66
莹石玻璃	1.72

表 1-2 不同波长所能取得的分辨率

设 $NA = 1.4$	绿 光	蓝 光	紫外线
波长/nm	546	436	365
分辨率/ μm	0.19	0.16	0.13

(三) 放大率(magnification)

放大率也称放大倍数,是指被检物体经物镜和目镜放大后,人眼所看到的最终图像的大小和原物体大小的比值。放大率等于物镜的放大率和目镜的放大率的乘积。物镜和目镜的放大倍数都被刻在它们镜筒的外表面。从原理上讲,放大率可以做得非常大。但是,如果物镜不能分辨标本的细节,放得再大也毫无意义。经理论推导,显微镜的有效放大率($M_{\text{有效}}$)是在物镜的数值孔径的 500 ~ 1 000 倍之间,即

$$500 NA \leq M_{\text{有效}} \leq 1000 NA$$

在有效放大率范围内,眼睛可以长时间观察而不易疲劳。如果放大率低于 500 NA,观察起来就很吃力。如果高于 1 000 NA,则会使像质变坏,造成不真实的像。因此,超过 1 000 NA 的放大率称为无效放大率。

使用显微镜时,在考虑其总放大率的同时,应首先选取所用物镜的放大率,其次考虑照相目镜或观察用目镜的放大率,原因在于显微镜的成像质量主要取决于物镜的分辨率。

在进行显微镜观察时,通常都使用 10 × 的目镜。高级研究用显微镜通常只配置一对 10 × 的目镜。可以说,10 × 的目镜是“标准目镜”。在需要进行高倍镜检时,应首先考虑到更换物镜,而

不要一味地追求更换观察用目镜。

(四) 焦点深度(depth of focus)

将显微镜的焦点对准某一物体点时，不仅这一物体平面可以看清楚，而且和它相连的上、下两个物体平面也能同时看清楚。这上、下两个物体平面之间的距离叫做焦点深度，简称焦深。

焦深与数值孔径及总的放大倍数成反比。数值孔径越大、总放大率越大，焦深越小。显微镜的焦深是很小的，如使用 NA 为 1.25 (100 倍的油镜, 12.5 倍的目镜) 观察时，焦深只有 $0.27 \mu\text{m}$ 。这就是说，调焦后一次只能看清楚 $0.27 \mu\text{m}$ 厚的一个薄层。而普通标本一般都有几微米厚，要想将标本看完整，只能使用显微镜的微调机构，自上而下分层观察。

由此可见，放大倍数越高的物镜，其数值孔径越大，焦深越小，反之焦深则越大。两种物镜的焦深比较见表 1-3。

表 1-3 两种物镜的焦深比较

	物镜 NA	目 镜	焦 深
I	40×0.65	$5 \times$	$2.8 \mu\text{m}$
II	100×1.25	$10 \times$	$0.29 \mu\text{m}$

(五) 视场 field of view 直径

视场直径又称视场宽度或视野，是指显微镜观察时所看到的圆形视场或视野范围。它的大小取决于目镜里的视场光圈，视场越大，观察物体就越方便。物镜与目镜一旦设计好后，其视场宽度便已固定。一般显微镜的视场较小，不可能在一个视场内看到整个标本的所有物体，只有借助于移动器，使标本的各部分依次进入视场，轮流观察。

(六) 覆盖差 difference of coverglass)

覆盖差是指光源通过非标准厚度盖玻片时因光路改变而产生的像差。覆盖差的大小可直接影响显微镜的成像质量。

国际上规定，标准盖玻片的厚度为 0.17 mm ，允许的误差范围为 $\pm 0.01 \text{ mm}$ 。物镜的外表面通常都刻有 0.17 的字样，其含义为盖玻片的厚度要求是 0.17 mm ，物镜在制造时已经将因标准盖玻片厚度而引起的像差计算在内。

显微镜的油镜头不存在覆盖差的问题，因为镜头油和盖玻片的折射率都在 1.52 左右，因而形成均匀的光学系统。但在使用油镜时，盖玻片如果过厚，超出了工作距离，也会无法调焦，甚至看不到图像。不同倍数物镜的工作距离示意图见图 1-3。

(七) 工作距离(working distance)

工作距离是指物镜前透镜的表面到被检物体上表面之间的距离。它与焦距是两个概念，平时习惯所说的显微镜“调焦”实际上就是调节工作距离。物镜的放大率越高，工作距离越短(图 1-3)。

在物镜数值孔径一定的情况下，工作距离短，孔径角就大。例如， $40 \times$ 物镜工作距离不超过 0.6 mm ， $100 \times$ 油镜工作距离则不足 0.2 mm 。为有效地保护镜头，物镜前透镜处多带有“弹簧装置”。

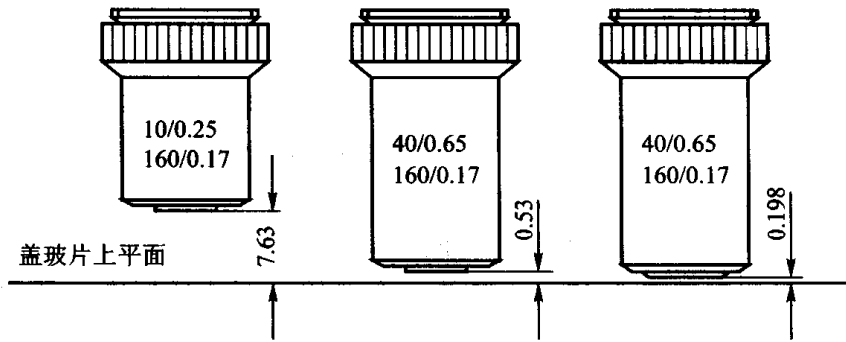


图 1-3 不同倍数物镜的工作距离示意图

(八) 镜像亮度与视场亮度

镜像亮度 (mirror-image brightness) 是指显微镜中所看到的物像的明暗程度。要求观看时既不感到暗淡, 又不觉得耀眼, 使眼睛感觉不到疲劳。

镜像亮度与视场亮度是两个不同的概念。镜像亮度是指显微镜下图像的明暗程度, 而视场亮度则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, 还直接受聚光镜、光栅和光源等因素的影响。在不换物镜和目镜的情况下, 视场亮度大, 镜像亮度也大。在观察标本和显微摄影时, 更重要的是镜像亮度。只有镜像亮度适中, 才能得到满意的效果。

上述八个参数之间是互相联系、互相制约的, 在使用中应根据具体情况, 照顾重点, 兼顾其他。人们使用显微镜的根本目的是要看清楚样本的细节, 从这个前提条件来看, 分辨率应摆在首位, 放大率摆在第二位, 其余各参数应列入从属地位。因为前两个参数是决定被检物体能否看得见的问题, 其余各参数只是决定使用方便不方便或观察效果好不好的问题。

第二节 医用显微镜的基本构造

医用光学显微镜的基本构造分为两部分。一部分是光学系统, 如目镜、物镜、聚光器、光源等; 另一部分是机械系统, 如镜座、镜臂、镜筒、载物台、物镜转换器、大小螺旋、推进器等。

一、光学系统

显微镜的光学系统主要包括物镜、目镜、聚光镜、光源系统和滤光片等部件 (图 1-4)。

(一) 物镜 objective)

物镜是显微镜的最主要部件, 其优劣直接决定了显微镜的放大率及分辨率等主要光学性能。

为了校正像差 (指所成的像与原物在形状上的差别) 和色差 (指所成的像与原物在颜色上的差别), 物镜由多块透镜组成, 而且放大倍数越高, 结构越复杂。

有的高倍物镜和油镜内还装有弹簧, 在物镜前端受压时, 镜头可以退缩回来。这样一方面可以保护镜头, 另一方面也不会把载玻片和盖玻片压碎。这种物镜称为弹簧物镜。除物镜的前端有弹簧装置外, 整套物镜由低倍至高倍必须齐焦 (物镜转换后成像清晰度基本相同)、合轴 (物镜和目镜的光轴应在一条直线上)。齐焦性能的优劣和合轴程度的高低是衡量显微镜质量的一个

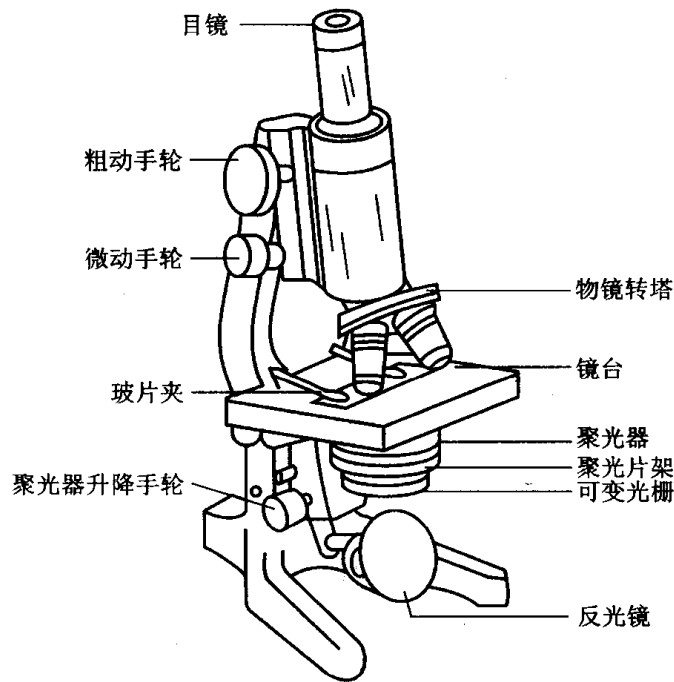


图 1-4 显微镜的基本结构

重要标志。

1. 分类 显微镜的物镜虽然细分起来多达数百种，但是一般可采用下述三种方法进行

分类：
 (1) 按物镜使用空间介质的不同可分为干燥系物镜（使用时，物镜与标本之间以空气为介质）和油浸系物镜（简称油镜，使用时物镜与标本之间以油类为介质）。

(2) 按物镜的放大倍数不同可分为低倍物镜（放大 10 倍以下）、中倍物镜（放大 10 ~ 25 倍之间）、高倍物镜（放大 40 ~ 80 倍之间）和油浸物镜（放大 90 ~ 100 倍之间）。

(3) 按物镜对像差和色差的校正程度不同可分为消色差物镜（Ach）、复消色差物镜（Apo）、平场消色差物镜（Plan, Ach）、平场半复消色差物镜和平场复消色差物镜（Plan, Apo）等五种。这五种物镜的区别主要是消除色差与校正场曲（像场弯曲）的程度不同，其性能和复杂程度均是递增的，即平场复消色差物镜质量最好，结构也最复杂，其价格也最高。

2. 识别 物镜通常都标有表示物镜光学性能和使用条件的一些数字和符号，如“40/0.65”和“160/0.17”。此处的 40 表示它的放大倍数（有的写成 $40\times$ 或 $40:1$ ），0.65 表示它的“数值孔径”（有的写成 N. A. 0.65 或 A. 0.65），160 表示使用该物镜时显微镜的机械筒长应为 160 mm（所谓机械筒长是指取下物镜和目镜以后所剩下的镜筒长度，国际标准规定为 160 mm），0.17 表示使用该物镜时盖玻片的厚度应为 0.17 mm。有些低倍物镜在有、无盖玻片的情况下都可以使用，所以不标 0.17 而代之以横线“—”。有些油镜上标有“油(oil)”字。

(二)目镜(eyepiece)

目镜的作用是把经物镜放大的实像（中间像）再放大一次，并把物像映入观察者的眼中，实质上目镜就是一个放大镜。显微镜的分辨能力是由物镜的数值孔径所决定的，目镜只是起放大

作用。因此，尽管目镜可将影像再次放大，但它仍无法看清物镜不能分辨出的结构。目镜有单目和双目两种工作方式。

目镜的结构较物镜简单，一般仅由 2~5 片透镜分两或三组构成。上端的一块（组）透镜称“接目镜”，下端的透镜称“场镜”。两块透镜之间有一个环状光栅，用它来限制视场的大小，通常把它叫做“视场光圈”，它的作用是限定有效视场的范围，舍弃四周的模糊像。物镜放大后的中间像就落在视场光圈平面处，目镜中的指示标志（即粘在光栅上的细丝）、目镜测微尺等均放在这个位置。

目镜可分为惠更斯目镜（Huygens eyepiece）、冉姆斯登目镜（Ramsden eyepiece）、平场补偿目镜、平场广视野目镜和其他特殊目镜等多种。前两者都以发明者的名字命名，其中惠更斯目镜在普通显微镜上用得最多。平场补偿目镜一般标有“P”，国产的也有标有“PB”的。它和平场物镜相配用，属于高档目镜。

（三）聚光器（condenser）

聚光器又称聚光镜，装在载物台的下方。它由聚光镜和可变光栅两个部件组成。聚光镜不仅可弥补光源亮度的不足和适当改变从光源射来的光线性质，还能将光线聚焦于被检物体上，以得到最强的照明光线，以便观察。普通聚光镜的结构如图 1-5 所示。可变光栅又叫光圈或虹彩光栅，装在聚光镜的下方，由十几块金属薄片组成。中央通光孔为圆形，移动可变光栅的把手可以调节通光孔的大小，使光束的亮度发生变化。

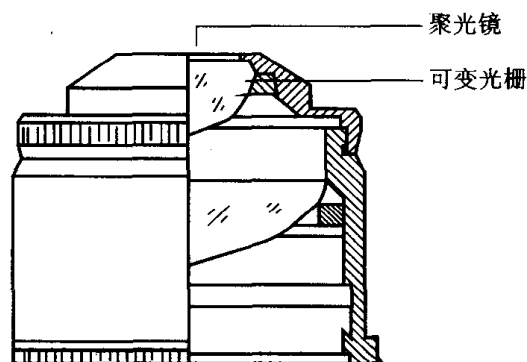


图 1-5 聚光器

除了上述普通的聚光镜外，还有暗视场聚光镜、相衬聚光镜、偏光聚光镜等多种不同用途的聚光镜，以满足不同场合的使用。

（四）光源系统

显微镜所用的光源有自然光和电光源两种。对采用自然光的显微镜，其光源系统有一个反光镜，它安装在聚光器下面的镜臂上。反光镜有两个反射面，一面为平面，另一面为凹面，可在水平和垂直两个方向上任意转动。它的作用主要是改变光线前进的方向，使光线射向聚光镜。

使用电光源的显微镜，其反射镜系统通常安装在灯座内。电光源多采用柯勒照明（Kohler illumination）方式，照明效果均匀、明亮。光源灯的电路部分设有光亮调节器，能很方便地改变光的亮度。

（五）滤光片

有些显微镜配有不同波长的滤光片供选用。使用滤光片后可以有选择地滤除某些光线或缩短光源波长，使观察效果更佳。

、机械系统

显微镜的机械系统是为光学系统服务的。只有精密、灵活、准确的机械装置与良好的光学系统密切配合，显微镜才能发挥其最高性能。

（一）镜座与镜臂

1. 镜座 是显微镜的基座，用以支撑整个镜体。简易显微镜的镜座多为马蹄形。电光源显微镜的镜座多为方形，其内部装有电光源系统。

2. 镜臂 呈弓形，立于镜座的上端，主要用来支撑镜筒和与镜筒相连接的光学元件。

（二）镜筒

镜筒是金属制的圆筒，其上端可插目镜，下端连接物镜。为了避免光学反射，镜筒的内壁都涂以无光黑漆。

镜筒可分为单目、双目和三目三种。

1. 单目镜筒 单目镜筒又有直筒和斜筒之分。双目和三目镜筒都是斜筒式的。单筒斜筒是在镜筒内安装一个反射棱镜，标本通过物镜到达镜筒的光线被棱镜以 45° 角反射进入目镜。斜筒式可做 360° 旋转，使用起来更加方便。

2. 双目镜筒 双目镜筒由左、右两个镜筒组成。镜筒的下部装有一套复杂的反射棱镜机构。为了适应视力不同的人使用，双目镜筒一般设计成可伸缩调节方式。调节范围通常在 $-5.00D \sim +5.00D$ 之间（即在 500 度近视和远视之间）。

3. 三目镜筒 三目镜筒是摄影显微镜需要配置的。它是在双目镜筒的上方又增加一个镜筒。在此镜筒上可加配照相机。这样既可以观察，又可以摄影。它有两种方式：一种是安装有一个可推拉的棱镜，推入时供平时观察用，拉出时光线全部进入摄影镜筒供照相用；还有一种是既可观察又可同时摄影的三目镜筒，它的光线 $20\% \sim 30\%$ 供观察用， $70\% \sim 80\%$ 供摄影用。在摄影时，可用摄影目镜进行调焦，当看到清晰的物像时再摄影，便可摄出清晰的照片。

（三）物镜转换器

物镜转换器装于镜筒下端，用来安装和转换物镜。按安装物镜的孔数不同，可分为多种，以三孔、四孔居多。按定位方式的不同，可分为外定位式和内定位式两种。但无论哪种方式，基本结构都是由固定在镜筒下端的固定盘和其下面的转动盘组成，物镜就分别安装在转动盘的几个对称的螺丝口上。外定位式转换器的定位弹簧安装在外面，内定位式的转换器的定位弹簧片安装在固定盘里面。当转动盘旋转至某一位置时，定位弹簧片上的凸棱落入定位槽中，发出“咔哒”一声响，便有一个物镜进入光路。继续旋转转动盘，可将各个物镜依次调在显微镜的光轴位置上。

对物镜转换器的精度有两点要求：同轴和齐焦。所谓同轴，是指每个物镜被定位即调入光路后，物镜和目镜的光轴应在一条直线上。所谓齐焦，是指用低倍物镜调焦后，从低倍转换到高倍物镜，无须使用粗调即可初见物象（但允许细调）。齐焦又称为“等高转换”。

（四）载物台与移动器

载物台用于承放标本，它与显微镜的光轴垂直。为了便于操作，常在固定式的载物台上增加一个移动器，叫做带移动器的载物台。当标本被夹入移动器后，使用移动器的横向和纵向调节旋钮，便可以上下左右移动标本。

（五）粗动调焦机构

粗动调焦机构简称粗调，是用来快速调焦的装置，由粗动手轮控制。旋转手轮，可以使物镜、目镜与载物台快速相对移动。

粗调有三种方式：镜筒升降式、镜臂升降式和载物台升降式。无论哪种方式，粗调的基本结

构都是由齿轮来带动齿条运动。转动手轮时，齿轮通过齿条带动镜筒（或镜臂或载物台）做相应的上升或下降。它们之间配合紧密、平稳，没有松动，可保证光学系统做平稳而准确的直线运动。

（六）微动调焦机构

微动调焦机构简称微调，是显微镜做精细调焦用的一种慢动装置。它由微动手轮控制，总调节距离一般为 1.8 ~ 3 mm。

第三节 显微镜的组装与调试

一、显微镜的组装

对新购或已经卸掉光学系统的显微镜，使用前必须组装光学系统并校正光轴。

（一）光学系统的安装

安装光学系统时，为了防止向下掉灰尘，应按照先上后下的顺序，即按照目镜、物镜、聚光镜、反射镜的顺序来安装。安装物镜时，先将镜筒升高，使转换器与载物台之间保持一定的距离。然后握住物镜，将其放入转换器的螺丝口处，先略向反时针方向旋转，待物镜配上丝纹后，再按顺时针方向旋入，旋至中等程度松紧即可。安装三个以上的物镜时，应根据物镜的放大倍数，从小到大顺时针安装。转换物镜时，不要用手推着物镜旋转，以免使物镜的光轴歪斜。应用手捏着转换器的转动盘旋转，或用手扶着与物镜转换器衔接的滚花外圆旋转。

目镜和物镜装好后，再将聚光镜插入载物台下面的聚光器支架内。插入的高度应使聚光器升至最高时，聚光镜上透镜的端面稍低于载物台的平面，以免载玻片与聚光器的镜头相碰。然后，将聚光器的固定螺丝旋紧。

对不是电光源的显微镜，最后再把反射镜插入聚光器下面的插孔内。

（二）校正光轴

显微镜在观察时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及可变光栅的中心必须跟显微镜的光轴在同一直线上，否则会使像差增大，分辨率和清晰度都要下降。对于带视场光栅的显微镜，先将可变光栅缩小，用 10 倍物镜观察，在视场内可见到视场光栅球状多边形的轮廓像，如此像不在视场中央，可利用聚光器外侧的两个光轴校正调整旋钮将其调到中央，然后缓慢地将视场光栅打开，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光栅的轮廓像完全与视场边缘内接，说明光线已经合轴。

显微镜的光轴校正好后，如果没有拆下聚光器或其他特殊原因，不必经常校正。

二、显微镜的调试与使用

显微镜结构精密，使用时必须细心，要按以下步骤进行。

1. 将显微镜从柜子或镜箱内拿出时，要用右手紧握镜臂，左手托住镜座，平稳地将显微镜摆放到实验桌上。
2. 将显微镜放在自己身体的左前方，离桌子边缘 10 cm 左右，右侧可放记录本或绘图纸。
3. 镜检时，即使用单目显微镜，也须两眼同时睁开，用左眼观察，以便右眼绘图或记录。左手用来旋转微动手轮，右手用来旋动移动器。如一只眼睁，一只眼闭，眼睛容易疲劳，无法久看。

工作时间较长时，可两眼轮流观察。

4. 使用不带光源的显微镜时，可利用灯光或自然光通过反光镜来调节光照，但不能用直射阳光，直射阳光会影响物像的清晰度并刺激眼睛。

将10倍物镜转入光孔，将聚光器上的可变光栅开到最大位置，用左眼观察目镜中视野的亮度，转动反光镜，直到使视野的光照达到最明亮、最均匀为止。光线较强时，用平面反光镜；光线较弱时，用凹面反光镜。如果利用自然光，要尽量躲避窗框和窗外物体的干扰。自带光源的显微镜，可通过调节旋钮来调节光照强弱。

5. 调焦是显微镜使用中最重要的环节。对光完成后，升高镜筒，将标本玻片夹在移动器上，并将欲检查的部分移至载物台通光孔的中央，然后开始调焦。

无论做何种检查，均应从低倍镜开始。调焦时，先用粗动手轮将镜筒下降，使低倍镜的前透镜与盖玻片之间的距离略小于该物镜的工作距离（5 mm 以下）。为了避免物镜压在标本玻片上，可从侧面窥视。然后，一边从目镜中观察视野，一边利用粗动手轮将镜筒徐徐上升，待初见物像后，改用微动手轮做精细调焦，直至物像最清晰为止。低倍物镜的视场大，有利于观察标本的全貌。也可利用移动器寻觅观察的目标。如有必要，可将寻得的目标移至视场的中心，为高倍镜观察做好准备。

从低倍镜转换为高倍物镜时，如果物镜是显微镜的原配物镜，所用的载玻片、盖玻片又符合标准，一般都可以进行“等高转换”（即转换后，只要稍微调节一下微调旋钮，即可看到清晰的图像）。但油镜不强求齐焦，最好先将镜筒升高后再转换，最后按低倍镜的调焦方法重新调焦。

使用油镜调焦的方法如下：先将镜筒升高，取下标本玻片，稍稍降低聚光器，并在聚光器的镜头上滴两滴香柏油（油中不应有气泡。如有，可用小木签除去），再将标本玻片放回原处，把聚光器升高，使载玻片的底面与香柏油接触，这样就完成了聚光器的油浸。接着，在盖玻片上滴上一滴香柏油，然后从侧面窥视，利用粗调使镜筒尽量下降，直至油镜的前透镜浸没在香柏油中（但尚未接触玻片），这样又完成了物镜的油浸。然后，一边从目镜中观察，一边利用微动手轮将镜筒缓缓上升（注意不要拧错了方向，以免压碎盖玻片），直至视野中出现最清晰的物像为止。

聚光器的油浸还可以采用另一种滴油方法，即不直接把油滴在聚光器的镜头上，而是把载玻片翻过来，将油滴在载玻片的底面上，然后再翻过去，对准放置于聚光器上面，再使聚光器上升，来完成聚光器的油浸。这种方法虽然不那么顺手，但比较安全。有些人使用玻璃棒直接与聚光镜接触来涂抹香柏油，这种方法容易划伤镜片，不宜采用。

在使用油镜时，允许在聚光镜与标本之间不加香柏油，即聚光镜上仍以空气为介质，但这会牺牲物镜的分辨率。

如用油镜观察后，又需要转回高倍物镜观察，应将盖玻片上的油擦去，以免玷污高倍物镜。但聚光器上的油可以不擦，只要把光栅适当缩小一点即可。

油镜使用完毕后，要及时将香柏油擦拭干净。可先用干净的擦镜纸将镜头擦几次，把大部分的油擦掉，然后用二甲苯滴湿的擦镜纸轻擦两次，最后用擦镜纸擦干净。聚光镜的擦拭方法与此相同。如标本需要保存，载玻片上的香柏油可用“拉纸法”擦拭干净。即将擦镜纸覆盖在玻片上，在纸上滴上一滴二甲苯，趁湿将纸条平拖着往外拉，连续几次即可擦拭干净。

最后应指出的是，在整个调焦（尤其是高倍物镜和油镜的调焦）过程中，每个动作都要缓慢进行。否则，物像会一闪而过，找不到观察的目标。

三、显微镜的维护与保管

显微镜是一种高档光学仪器，必须精心维护，妥善保管。

(一) 经常性的维护

1. 防尘 光学元件表面落入灰尘，不仅影响光线通过，而且经光学系统放大后，会生成很大的污斑，影响观察。灰尘、砂粒落入机械部分，还会增加磨损，引起运动受阻，危害同样很大。因此，必须经常保持显微镜的清洁。

2. 防腐蚀 显微镜不能和具有腐蚀性的化学试剂（如硫酸、盐酸、强碱等）放在一起。

3. 防热 防热的目的主要是为了避免热胀冷缩引起镜片的开胶与脱落。

(二) 使用中的维护

使用时一定要正确操作，小心谨慎。在不少情况下，仪器的损坏是由于操作粗心或操作方法错误引起的。例如：

1. 微调是显微镜机械装置中较精细而又容易损坏的元件，拧到了限位以后就拧不动了，此时决不能强拧。调焦时如遇到这样的情况，应将微调退回几圈，再用粗调调焦，待初见物像后，再改用微调。如能事先将微调调至中间位置（一般在微动燕尾的侧面上刻有位置标记“—=”，当微动燕尾上的单线对着两横线的中间时，微调即处于中间位置），使正、反两个方向都有大体相等的调节余量，当然更好。

2. 使用高倍镜观察液体标本时，一定要加盖玻片。否则，不仅清晰度下降，而且试液容易浸入高倍镜的镜头内，使镜片遭受污染和腐蚀。

3. 油镜使用后，一定要擦拭干净。香柏油在空气中暴露时间过长就会变稠和干涸，很难擦拭。镜片上留有油渍，清晰度必然下降。

4. 仪器出了故障不要勉强使用，否则可能引起更大的故障和不良后果。例如，在粗动手轮不灵活时，如果强行旋动，会使齿轮、齿条变形或损坏。

以上只是几个例子，类似的情况还很多，使用者必须注意。

(三) 保管

显微镜在潮湿的状态下，光学镜片容易生霉。一旦生霉，很难除去。内部的镜片由于不便擦拭，潮湿对其危害性更大。机械零件受潮后容易生锈。为了防潮，除了选择干燥的房间外，存放地点也应离墙、离地，远离湿源、热源。显微镜箱内应放置 1~2 袋硅胶作干燥剂。同时，也要注意防尘和防腐蚀。

四、光学系统的清洁

对于显微镜各光学部分的表面，一般用干净的毛笔清扫或用擦镜纸擦拭干净即可。当镜片上有污物、油渍或手指印，或镜片生霉、生雾，或长期停用后复用时，需要进行认真的擦拭。

1. 擦拭时允许拆开目镜和聚光镜。物镜因结构复杂，装配时又需要专门的仪器来校正才能恢复原有的精度，故严禁拆开。

拆卸目镜和聚光镜时，要注意以下几点：

(1) 小心谨慎，轻拿轻放。

(2) 拆卸时要标记各元件的相对位置（可在外壳上划线作标记）、相对顺序和镜片的正反

面，以防重装时弄错。

(3) 操作环境保持清洁、干燥。拆卸目镜时，只要从两端旋出上、下两块透镜即可。目镜内的视场光栅不能移动，否则会使视场界线模糊。聚光镜旋开后严禁进一步分解其上透镜。其上透镜是油浸的，出厂时经过良好的密封，再分解会因破坏其密封性而使其损坏。

2. 擦拭时先用干净的毛笔或吹风球除去镜片表面的灰尘，然后用干净的绒布从镜片中心开始向边缘做螺旋形单向运动。擦完一次把绒布换一个地方，直至擦净为止。如果镜片上有油渍、污物或指印等难以擦掉时，可用木条裹上脱脂棉，蘸少量乙醇和乙醚混合液（乙醇：乙醚 4:1）擦拭。如果有较重的霉点或霉斑无法除去，可用棉签蘸水润湿后沾上碳酸钙粉（含量为 99% 以上）进行擦拭。擦拭后，应将粉末清除干净。镜片是否擦净，可用镜片上的反射光线进行观察检查。要注意的是，擦拭前一定要将灰尘除净。否则，灰尘中的沙粒会将镜面划起沟纹。擦拭时乙醇乙醚混合液不可用得太多，以免脱胶。镜片表面有一层紫蓝色的透光膜，不要误作污物来擦拭。

第四节 几种常见的医用显微镜

一、暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark field microscope）是根据丁达尔（Tyndall）效应原理设计的一种在黑色背景条件下观察被检物体的显微镜。

在一般条件下，人们无法看清室内的灰尘，这是因为灰尘颗粒受强光直射及绕射等因素的干扰，使我们无法看清它原本的形状。但如果在室内黑暗的条件下，让光线通过窗口，我们就可很容易地看见灰尘颗粒的存在。这是因为在光反射或衍射的时候，灰尘颗粒似乎增大了体积，故明显可见。暗视野显微镜就是利用这一原理，采用特殊方法不让直射光进入物镜的镜头，而是先让直射光经过暗视野聚光器后改变途径，使其斜向射向被检物体。被照射物体的表面产生的反射或衍射光进入物镜的镜头，从而形成印衬在黑色背景下的明亮图像。运用这种方法，在镜检时能观察到物体的存在与否、运动及外部形态，但很难分辨出其内部的细微结构。

暗视野显微镜的优越性在于用它能观察到明视野条件下观察不到的极其微小的物体，可以判断物质颗粒的存在与否。暗视野显微镜的最高分辨率可达 $0.004\ \mu\text{m}$ ，是光学显微镜中分辨率最高的一种，所以，暗视野显微术又被称为“超显微术”。

使用暗视野显微镜镜检时，必须调整好中心光轴，其照明光源的调整仍然以柯勒照明为基础，但要求强光照射，特别是对于高倍镜来说更是如此。

使用暗视野显微镜镜检时要求载玻片和盖玻片必须无疵痕和灰尘，物镜前透镜也必须清洁无尘。载玻片与盖玻片的厚度应符合标准。载玻片太厚，聚光镜的焦点落在载玻片内而达不到被检物体的平面上；盖玻片太厚，在使用油镜头的情况下，由于物镜的工作距离很短，可能导致无法调焦，看不到或看不清被检物体。

二、荧光显微镜

（一）工作原理

荧光显微镜（fluorescence microscope）是指用紫外线（不可见光）作光源照射被检物体，使之

激发后产生人眼可见的荧光进行镜检的显微术。荧光镜检方法是生物、医学及一些相关学科中的重要研究手段，它主要用于对生物组织、生理、病理、微生物、医药、食品、化学等领域的鉴定工作。

采用荧光显微镜，可以观察到普通显微镜看不见的无色透明的组织或细胞。一般是先将这些标本用荧光色素染色，再将标本放在荧光显微镜下，用紫外光线照射激发，使标本发出荧光（可见光），然后通过显微镜观察标本的荧光图像。由此可见，荧光显微镜的光源不是作为照明用的，而是作为激发光，去激发荧光色素产生荧光。

用荧光显微镜看到的荧光有两种，一种是受激发光照射时物质本身发出的荧光，叫做“自发荧光”或“固有荧光”；另一种是物质要先经荧光色素染色才会产生荧光现象，被称为“继发荧光”。在医学检验中，大部分测量工作用的都是继发荧光。

不同的荧光物质所需要的激发光的波长不尽相同，而且受激后所产生的荧光光波也不相同。常用荧光染料使用浓度及处理时间见表 1-4。

表 1-4 常用荧光染料使用浓度及处理时间一览表

名 称	浓度/%	处理时间/min
吖啶橙	0.1 ~ 1.0	0.5 ~ 3
荧光红	0.1 ~ 1.0	0.5 ~ 3
伊红 Y	0.1	1 ~ 2
金色胺	0.1 ~ 1.0	0.5 ~ 3
酸性品红	0.1	1 ~ 2
玫瑰红 B	0.1	1 ~ 10
玫瑰红 G	0.1 ~ 0.001	1 ~ 3
甲基绿	0.1 ~ 0.01	1 ~ 3
刚果红	0.1	1 ~ 2
中性红	0.1 ~ 0.005	5 min 至数小时
硫酸黄连素	0.1 ~ 0.002	1 min 至数小时

注：被检物经荧光染料处理后，荧光的颜色基本上与染料的颜色相似，但在不同波长紫外线激发下，其颜色也有差异。

（二）结构特点

首先要有一个能产生高能紫外线的光源。一般采用汞灯或氙灯作紫外光源，也有用溴钨灯的。紫外光源因其功率较大（100 W 以上），尤其是汞灯和氙灯所需要的电压高达上千伏，一般都专门设一个电源箱来供电。

其次是从光源灯到标本之间，紫外线所经过的所有光学元件均需用对紫外线通透性能好的材料（如石英）制成。普通的光学玻璃不能透过波长 320 nm 以下的紫外线。如果所用的激发光线波长较长（如在 350 nm 以上），则普通光学玻璃也能使用。

最后，在光源与标本之间需要设置激发滤光片，用以选出照射标本所用的激发光。在标本和目镜之间设有荧光（或称发射）滤光片，该滤光片只让荧光通过而隔断紫外线（紫外线对眼睛有

伤害)。激发滤光片和荧光滤光片可以各有多块，以备满足不同的需要。

三、透射式荧光显微镜

根据光线对标本照射方式的不同，荧光显微镜可分为透射式和落射式两种。透射式显微镜除在光路中增加了激发和荧光两块滤光片外，其余部分和普通电光源显微镜基本相同。为了避免直射光进入视场，透射式显微镜使用了暗视场聚光器，当然，也可以不使用暗视场聚光器。透射式显微镜适合于观察无色透明的标本，临床应用较广。

四、落射式荧光显微镜

从光源发出的激发光经集光镜会聚，再经聚光镜和激发滤光片后射向分镜。分镜具有能反射波长较短的紫外线而让波长较长的荧光通过的特性。激发光经它反射后射向物镜，再经物镜聚光垂直射向标本。标本受到激发后产生出荧光，荧光经过物镜和分镜后到达荧光滤光片。荧光滤光片将标本产生的荧光之外的杂光滤除掉，只让荧光通过目镜送入人眼中。这种装置的光源处在标本的上方，故称为落射式。落射式荧光显微镜适用于观察透明度不好的标本以及各种活体组织。在使用时应注意：

1. 用激发光长时间照射标本会发生荧光衰减和消失现象，故应尽可能缩短照射（观察）时间。暂时不观察时，可用挡板遮盖激发光源。
2. 在油浸观察时，应采用“无荧光油”，在使用紫外和紫色激发方式观察时更应注意。香柏油可产生青色荧光。
3. 标本所发的荧光较弱，应尽可能在较暗的室内条件下进行观察。使用带有遮光罩的目镜时应将遮光罩拔出，以防杂光进入干扰。
4. 避免直视紫外线光源，将紫外线防护板（黄色）装在载物台前以防紫外线损伤视网膜。
5. 电源应装置稳压器，电压不稳会降低高压汞灯的使用寿命并影响镜检效果。

第五节 显微摄影术

一、显微摄影的常用装置

显微镜的摄影装置主要由光源、聚光器、显微镜主体和摄影器材四部分组成。

1. 光源部分包括灯泡、集光镜和滤色片等。
2. 聚光器部分包括可变光栅、聚光镜、磨砂玻璃。

显微镜主体部分包括物镜、镜筒、目镜等。

摄影器材包括照相机、近摄皮腔（或接圈）、快门、底片盒和感光片等（图 1-6）。

二、感光胶片的性能及选择

感光胶片的性能主要由感光度来衡量。感光度是指感光片对光线作用的敏感程度，它是胶片感光快慢的标志，也是确定曝光量的主要依据。感光度越高，需要的曝光量越少，曝光时间越短，反之则曝光时间越长。如胶卷的感光度在 33° 时，要比在 15° 时感光速度快得多。标准主要

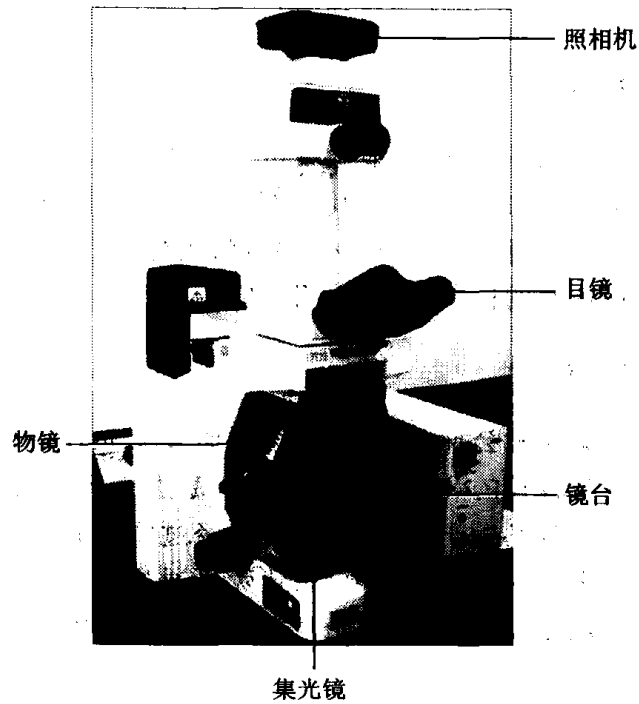


图 1-6 摄影显微镜

有德国的“DIN”（定或称度，是德国工业标准感光片感光度单位）、中国的“GB”（国标）、美国的“ASA”（American Standards Association，美国标准协会）、国际标准的“ISO”（International Standards Organization 国际标准化组织）制。“DIN”制和“GB”制相同，每相差 3° 时，感光速度相差一倍；“ASA”制是数字相差一倍时，感光速度相差一倍；国际标准的“ISO”制则是同时标出两种制式的相应感光度。各种感光度的换算方法见表 1-5。

表 1-5 各种感光度对照表

德国和中国标准 DIN/GB 制	美国标准 ASA 制	国际标准 ISO 制
7°	4	4/7 $^\circ$
8°	5	5/8 $^\circ$
9°	6	6/9 $^\circ$
12°	12	12/12 $^\circ$
15°	25	25/15 $^\circ$
18°	50	50/18 $^\circ$
21°	100	100/21 $^\circ$
24°	200	200/24 $^\circ$
27°	400	400/27 $^\circ$
30°	800	800/30 $^\circ$
32°	1 250	1 250/32 $^\circ$
33°	1 600	1 600/33 $^\circ$

胶片的感光度按速度的高低，可大体分为三类：

高速胶片一般为 24DIN(ASA200)、27DIN(ASA400) 以上的胶片，其特点是感光速度快，常用于体育运动、夜间摄影、室内摄影等。高速片宽容度大，颗粒较粗，反差较小。

中速胶片在日常生活中使用最多，一般指 21DIN(ASA100)和 18DIN(ASA50) 胶片。其特点是感光速度适中，广泛使用于人像、风景及显微镜摄影。这类胶片宽容度适宜，颗粒性较好，反差也较好。

低速胶片通常指 15DIN(ASA25)、12DIN(ASA12) 以下的胶片，其特点是反差较大，颗粒较细腻，非常适用于显微镜摄影和景物翻拍。缺点是宽容度较小，曝光及冲洗时需格外小心。

感光材料的选用对显微摄影至关重要。它不仅直接关系到镜下的结构能否真实而有效地被记录下来，还会影响到所拍的影像在后期制作中能否达到满意的效果。

在使用黑白胶卷进行显微摄影拍摄时，可根据拍摄对象的不同做如下选择：

(一) 制片标本胶卷的选择

临床检验大多用的是制片标本，可选取感光度为中速或中低速感光度胶片，这样既能保证所拍底片有足够细的颗粒度，又能保证其具有相对高的反差。最好采用感光度为 18DIN(ASA50) 或 15DIN(ASA25) 的全色胶片。

如买不到这种感光度的胶片，我们可以采用 21DIN(ASA100) 的全色胶片。这类胶片因颗粒相对较粗、反差较小而不太适用于显微摄影，因此在用 21DIN 全色胶片时应注意使用反差滤色镜来提高反差。冲洗胶片时也要考虑使用超微粒或微粒的显影液配方，以达到在一定范围内降低颗粒度和提高反差的的目的。

(二) 活体标本胶卷的选择

活体标本因在镜下活动速度很快，即便采用药品麻醉或压片法也很难得到理想的结果。在这种情况下，最好采用感光度较高的高速感光胶片，如 27DIN(ASA400) 或 24DIN(ASA200) 的全色胶片。要注意这类高感光度胶片的颗粒粗，反差小，在拍摄和冲洗过程中要用反差滤色镜来提高反差和用超微粒显影液来降低底片的颗粒度。

(三) 荧光染色标本胶卷的选择

在荧光显微镜或暗视野显微镜条件下拍摄标本时，因曝光时间长，通常也需采用 27DIN 或 24DIN 的高速度胶片。拍摄这类照片时，除要求采用高速胶片外，还应注意在一定程度上人为地校正电脑上的曝光数值。曝光时间过长容易导致出现倒易率失效 (reciprocity failure)。倒易率失效是指因曝光不足或过度而引起的色彩还原不良的现象。故在进行拍摄时必须注意及时调整，否则会达不到预期的效果。在某些显微摄影的控制器上提供了世界上主要胶卷牌号的倒易率失效参考表，使用时可参照表上提供的数据进行调整。

用于彩色显微摄影的彩色胶卷分为彩色负片和彩色反转片。彩色负片经冲洗后得到的是与原景物色彩及影像互补的负像(底片)，而彩色反转片经反转工艺冲洗加工后可直接得到与原景物完全相同的正像。拍彩色片时除了要按感光度选择胶片外，还应按彩色胶片本身对色温的不同要求来调节色温，以求得所用胶片的色彩平衡。

色温是光源的色温度，是指将绝对黑体加热至不同温度时所呈现出的不同颜色的光线。不同的光源，只要光线的颜色相同，则都有相同的色温。色温的高低实际上只意味着光源所含红、蓝色光的不同比例，与实际的冷热温度无关。其单位名称为开尔文，单位符号为 K。