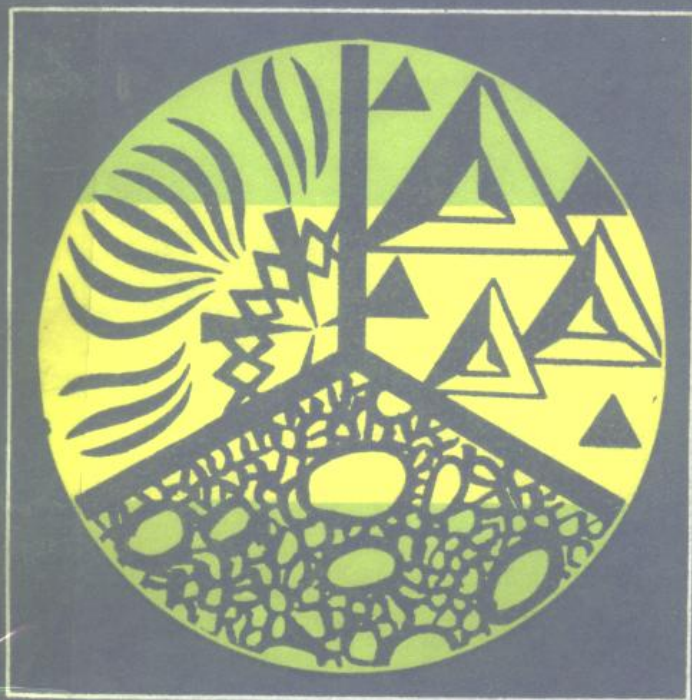




〔美〕柯达公司 编著 ●

显微摄影术

08247
TB873
86-19

显微摄影术

〔美〕柯达公司 编著

喻 珈 译

喻诚鸿 校



科学出版社

1981



S0224125

内 容 简 介

本书是一本显微摄影技术的入门书。书中系统介绍了显微摄影的四个重要组成部分——光学显微镜、照相机、生物制片技术及摄影器材的基本理论和实践。比较详细地介绍了彩色与黑白片的显微摄影技术及应用、显微摄影中的常见毛病、显微摄影中的特种技术与应用,如荧光、红外、紫外显微摄影等。书后附有显微摄影常用词汇。

可供从事生物学、医学、农业科学研究的科技人员,有关院校师生及其他显微摄影工作者参考。

Eastman Kodak Company
PHOTOGRAPHY THROUGH
THE MICROSCOPE
1974

显 微 摄 影 术

〔美〕柯达公司 编著

喻 珈 译

喻诚鸿 校

责任编辑 马素卿

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1981年12月第一版 开本:787×1092 1/32

1981年12月第一次印刷 印张:5 3/8 插页:6

印数:0001—6,450 字数:118,000

统一书号:13031·1760

本社书号:239P·13—10

定价: 1.15 元

引 言

用复式显微镜摄影的技术称之为显微摄影。它牵涉到照相机与显微镜二者的配合以及照明的有效使用。一张显微摄影照片的质量几乎完全有赖于显微镜所产生的图象的质量。因此要产生好的显微照片首要的先决条件是对显微镜原理与操作的全面了解。

显微摄影是使很小的微观物体产生一个大的录象。显微摄影切忌与缩微摄影一词相混淆，后者是指对大的对象摄出极小的图象。

虽然任何一种类型的显微镜都能用之于显微摄影，但最普通的是“明视野”(亦称明视场)照明显微镜。样品或所观察的对象是暗的或着色的，而衬之以明亮的、近乎白色的背景，“明视野”一词即由此得名。这类显微镜在所有的生物实验室及讲授生物学的学校中都可以找到。

为了有效地使用显微镜，就必须具有良好的操作该仪器的知识。它包括：光学部分的效能与极限、显微镜的调节、如何对标本使用照明，甚而包括如何制备标本以供观察。如果你想进行显微照相，就得有某些摄影知识，包括对感光材料的了解以及如何使一架照相机合宜地装到显微镜上。

应用显微摄影的原因虽多种多样，但主要是为了教学。将一张彩色幻灯片投影以供课堂观看要比每一个人都去用显微镜观察方便得多。显微照片常常用来作为研究的记录，或说明一篇论文中的某一特殊现象或情况。金属的显微照片常用来补充工程学或冶金学报告。

实际上在那些以显微镜为基本工具的每一个领域中，当判明需要放大的纪录图象时均采用显微摄影术。显微摄影对在中学以及学院中从事生物学、植物学、动物学、解剖学等实验研究的师生都是很重要的。在工业、医学研究、病理学、犯罪调查、农业及林业等方面甚至更为重要。

不管显微摄影的目的如何，你必须记住，它所记录的图象并不比在显微镜中所产生的图象更好一些，除非能从摄影术上来增大其反差。因此在显微摄影方面，首先要了解复式显微镜以及如何运用它在观察中取得最大的效益。

目 录

引言.....	vii
复式显微镜.....	1
一般原理.....	1
物镜.....	3
物镜的种类.....	3
筒长.....	5
光学象差.....	6
数值孔径.....	8
物镜的工作距.....	9
分辨力.....	10
目镜.....	12
聚光器.....	13
附件.....	14
机械载物台.....	14
视野取景器.....	15
放大倍数.....	15
景深.....	19
特别技术.....	20
切片技术.....	20
盖玻片的选择.....	21
油浸物镜的应用.....	22
在显微摄影中的照相机.....	25
通论.....	25
带镜头的照相机.....	25

简易照相机的放大倍数·····	28
不带镜头的照相机·····	30
反光照相机·····	30
皮腔延伸式照相机·····	30
显微摄影机·····	31
35 毫米目镜照相机 ·····	32
用散页片的目镜照相机·····	33
三筒镜上的附加照相机·····	34
具有可调节皮腔的照相机·····	35
防光通道·····	37
毛玻璃·····	38
照相机的震动·····	38
显微镜载玻片·····	40
如何制备显微镜载玻片·····	40
载玻片与盖玻片·····	40
组织切片·····	42
涂片·····	45
整体封藏·····	46
封藏媒质·····	46
化学结晶·····	48
如何照明显微镜载玻片·····	49
光源·····	49
照明器·····	51
照明的方法·····	52
孔径光阑的调节·····	57
场光阑的调节·····	58
聚光器·····	58
内装照明·····	59
图象的亮度与中性滤光片·····	59
彩色显微摄影·····	61

胶片	61
用于显微摄影的柯达彩色胶片	61
彩色胶片的选择	64
染色剂的表现	66
彩色胶片的冲洗	70
彩色胶片速度的提高	70
滤光片	71
柯达光平衡滤光片	72
柯达彩色补偿滤光片	77
中性密度滤光片	77
影响色平衡的因素	79
色温的变化	80
吸热滤光片	81
紫外辐射	82
中性密度滤光片	82
生物染料	82
封藏剂	83
色差	83
胶片乳剂的变化	85
倒易效应	85
黑白片的显微摄影	92
照相材料的性质	93
分辨力与颗粒性	94
曝光宽容度	96
显影宽容度	96
胶片速度	96
散页片及干版	97
胶卷	98
在黑白片显微摄影中的滤光片	99
提高反差	101

柯达雷登滤光片	103
负片的冲洗	104
印相	106
曝光方法	108
曝光试验	108
胶卷	108
散页片	110
曝光计算	110
曝光的鉴定	111
滤光系数	112
曝光表	114
取得曝光读数	116
曝光的记录	117
显微摄影中的常见毛病	119
较常见的毛病	119
图象不清晰	119
图象模糊	121
照度不匀	121
反差低	122
较少见的一些毛病	123
反差太强	123
分辨力差	123
视野中的亮点	123
快门叶片的象	124
焦点不实的斑点	124
特种技术及其应用	125
特种技术	125
反差系统	125
暗场法	126

遮光-反差法	128
相位差法	131
干扰相位差法	136
弗兰康 (Francon) 系统	139
偏振光法	139
立体方法	143
特殊应用	145
荧光显微摄影	145
紫外显微摄影	148
红外显微摄影	149
染色体的显微摄影	151
放射自显影的显微摄影	153
金相显微摄影	154
微型电子电路的显微摄影	155
复制片的录象	157
显微摄影术词汇	159

复式显微镜

一般原理

简单的放大系统是用单一的透镜单元构成物体的放大图象以供观察或投影。后者可以放映幻灯为例，一个可透射照明的幻灯片在银幕上形成一个放大的实象。如果移动银幕而在它的后面放置一个适当的透镜，并使其焦点落在幕平面上，则此透镜又可以在幕上形成此幻灯片的另一个图象。这就是在复式显微镜中的复式放大系统的基本原理。观察者用一个透镜去观察第一个或初级的图象就产生了一个叫做虚象的放大的第二级图象。这个图象就是我们眼睛所感受到的（见图1）。显微镜的另一个特征是透镜的焦距都比较短。在一定的

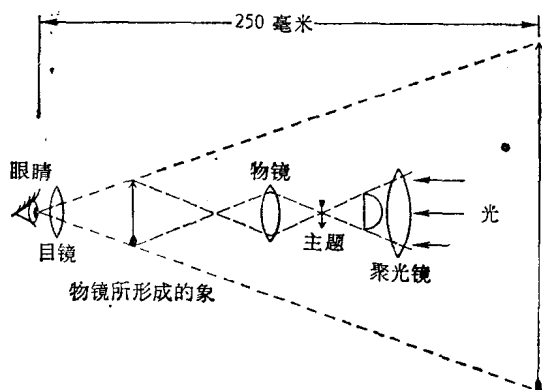


图1 复式显微镜原理简化图

由物镜形成的中间图象是通过目镜放大的，虚像是眼睛看见的，即目镜把实像投影到照相机。

象距内,焦距愈短,放大倍数也就愈大。在显微镜中,一个高倍的两级放大都是用这种短焦距透镜通过相当短的光径而取得的。

显微镜中的第一个透镜由于靠近被观察物体而被称为物镜。这个透镜把一个放大的象投影于一固定位置。物镜在固定距离内所产生的放大量叫做“放大率”。物镜的放大率可分为 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 直至 $100\times$ 等级。初级象的投影是在镜筒内进行的;从物镜的后焦面到初级象间的距离称为“光学镜筒长度”。

第二个透镜位于镜筒中的初级象之上。这个透镜叫做“目镜”,它在显微镜内形成一个第二级的进一步放大的图象。目镜与物镜一样,也用放大率来分级,有 $5\times$ 、 $10\times$ 或高到 $25\times$ 。

在显微镜中图象的放大总量或放大倍数可从目镜同物镜各自的放大率的乘积中求得。例如一个 $10\times$ 的物镜与一个 $10\times$ 的目镜产生一个 $100\times$ 的光学放大,通常也可以写成 $\times 100$ 。

从目镜射出的光线,聚在一称之为“出射点”的点上,这就是你观察显微镜下整个图象视野时,眼睛所要寻找的位置。此出射点也常称“冉斯登环”或“冉斯登圈”。从出射点到显微镜系统里的虚象距离为 250 毫米 (10 英寸)。

你也可以让图象从目镜投射到胶片平面来代替用显微镜观察。如果胶片平面或相机距出射点为 250 毫米,那么在胶片平面的放大倍数为物镜与目镜放大倍数的乘积。

在显微镜标本中的很细微的细节必须靠物镜来分辨。这种透镜必须具有足够高的质量才能分辨这些细节并产生一个有效的初级图象。目镜的主要目的是将物镜所形成的象进一步放大。此图象可因低质量的目镜而降低质量,但无论目镜

的质量如何都不能提高象的质量(就分辨力而言)。

物 镜

物镜的种类

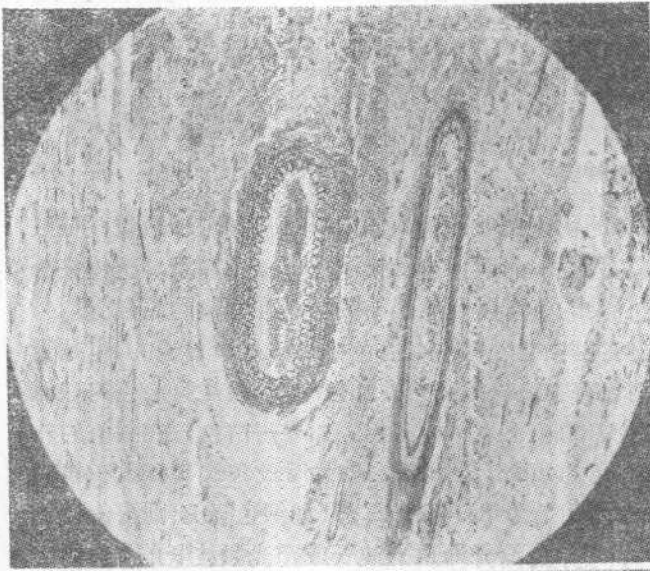
显微镜的物镜通常是按其放大率、机械筒长、数值孔径以及光学校正程度——消色差、复消色差或萤石型等透镜来分类的。这一类的资料以及焦距一般均刻在物镜的筒架上。

在任何类型的显微镜中,消色差物镜是最普通的、也是最便宜的。消色差物镜只校正一种颜色的,一般是黄绿色的球面差。它对色差的校正为两种颜色。如果用白色,在图象的外缘会出现有色的条纹。当用黑白胶片时此条纹可导致一模糊的象。如果所用的为单一的普通光(如绿色光),则图象会更清晰些。当用单色绿光即单一波长或窄光频波长的光,那么图象会更清晰。因此,在显微摄影时,在光路中放置一绿色的滤光片将获得最好的照片。当所用光的波长大于或短于此波长时,则可导致质量较差的图象。

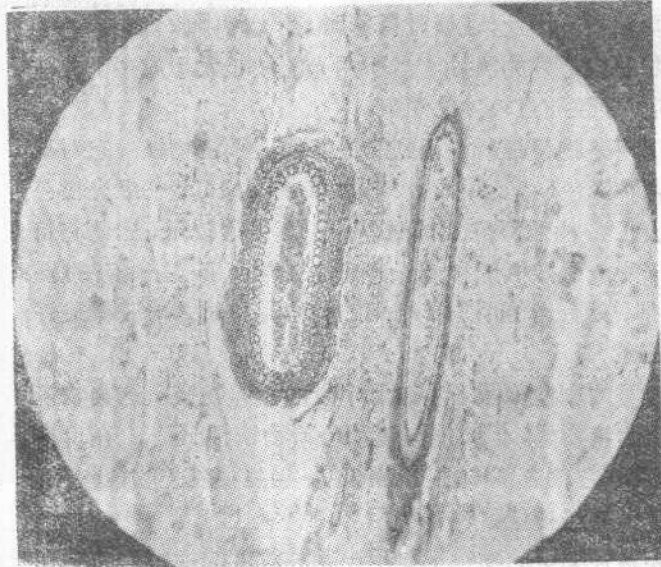
复消色差物镜是所能用到的最好的显微镜物镜。它对球面差作两种颜色(蓝及绿)的校正,并对红、绿、蓝初级光谱色作色差校正。由于对色及球面差作了高度的校正,因此它特别适用于彩色显微摄影和最能分辨细节并获得最出色的图象。但是,只有当使用与其相配的补偿目镜时才能获得最好的校正。

第三类的物镜称萤石物镜或半复消色差物镜。这类物镜较消色差物镜要好,但不能与复消色差物镜相比美。在价格与质量方面,它代表了一种“折衷型”。与复消色差物镜一样,要想好使就得与补偿目镜一块用。

上述各种类型的物镜都显示出某种程度的视野弯曲。在



(a)



(b)

图2 人体动脉的弹性纤维, $\times 40$ 。
(a) 视野弯曲; (b) 已校正过视野弯曲。

视野中央的图象清晰，而愈近周缘则愈模糊。这种影响在显微摄影中可以得到某种程度的克服，这就是在可能的情况下尽量把所记录的面积限制在视野的中央。也可以用一种特殊的目镜(留待后叙)使人满意地减低影响。

但是最好还是采用上述几种类型中的一种平场物镜。这类物镜的名称是在物镜前加一个字首——“平场”，如平场-消色差物镜、平场-复消色差物镜。在这类物镜的光学设计中，视野弯曲已被校正，它们特别适用于大视野的观察或显微摄影。

平场物镜要与补偿目镜或专为它们设计的目镜结合使用。因此，从视野的中央到视野的周缘上的焦点都比较均匀(见图2)。

绝大多数的物镜当用透射光时要用有“覆盖”的对象物，即要在标本上安放一“盖玻片”。盖玻片的厚度随物镜的不同规定为0.17毫米或0.18毫米。盖玻片厚度的规格取决于这样一个条件，即只有用一个正确厚度的盖玻片时才能校正物镜的球面差。偏离这一厚度可导致球面差的过度校正或校正不足，特别是对干燥系高孔径的物镜。

打算用反射光的物镜则不需要覆盖对象物。即在标本上不要加盖玻片。这一原则主要是对冶金用显微镜及金属标本而言。

用于明视野显微镜的大多数物镜被认为是“干燥”型。这就是说只有空气存在于物镜与标本载玻片之间。有些物镜属“浸液”型，即在物镜与标本载玻片之间有某种液体媒质，一般是某种特殊的油类。

筒长

物镜被旋进显微镜镜筒的底部，而目镜则插入显微镜抽

筒的顶部。物镜插入的位置与抽筒顶部间的距离叫“机械筒长”。

有些制造者规定机械筒长为 160 毫米，有的则为 170 毫米。在光学上来说，物镜都以一定的筒长来设计。如果它们用于一不同的筒长便不能达到它们预期的光学效果。所以如果不了解它们的规格便不能在不同的显微镜上互换使用。如果这样做的话就会影响图象的质量。有些显微镜备有可调节的抽筒，因而机械筒长可变换以与物镜的规格相符。然而，这一类的显微镜很少。由光学厂家设计的最新式的显微镜有固定的筒长。对于初学者来说最实际的办法就是只用与该显微镜同一厂家所制造的物镜。

有些显微镜应用具无定校正的物镜。其机械筒长是不固定的。这类物镜不能用于其它厂号的显微镜上，也不能把其它的物镜用于这种光学无定校正的显微镜上。在上述任何一种情况下图象的质量都是很差的。当某一物镜用于非规定的筒长时，它们的放大率就与标出的不同。例如一个为 160 毫米筒长设计的 $10\times$ 物镜，如果用在 170 毫米或更长的筒长时，其放大率则超过 $10\times$ 。与此相反，如用在短于所要求的筒长时，则放大率将降低。

除了造成放大率的误差之外，如果不用正确的筒长还会产生模糊图象。筒长过长会导致过度的校正，太短又会造成校正不足，两者都会使图象的清晰度模糊。

光学象差

如果用一个简单的正透镜投影初级放大的象，由于它固有的光学象差，其象的质量是很差的。所谓象差就是指一个透镜不能正确地使对象物与象的点与点之间完全对应。为了提高象的质量就必须设计尽可能校正这种象差的透镜。显微

镜的物镜对球差及色差作了校正。

球差

当光线通过一个透镜的中央及其边缘部分不能在距透镜等距离处聚焦时产生球差。这种情况之所以产生是由于光线在透镜的边缘折射较强,越往里越逐渐减弱,直到光学中心时达到零。点的象不成点而是较大的圆形面积。由无限多个点所组成的对象物的象,只要有球差存在就不可能清晰。白色光是由全色所构成,这些颜色按其各自特有的波长,其折射与焦点也各不相同。对于某种颜色作球差的校正是可能的,但不能同时对另一种颜色作校正。但这种象差可依靠在一固定的距离内形成象而部分地校正;这就是机械筒长的规格,见图3。

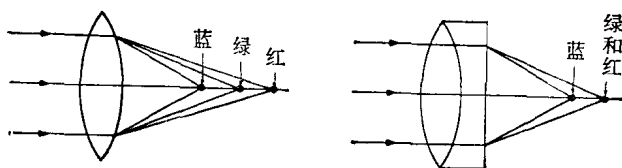


图3 左:一未校正的简单透镜。三个原色在光轴上的焦点不在同一点上。右:一消色差透镜使两个原色(一般是绿色和红色)在光轴上的焦点在同一点上。

色差

色差的出现是由于一个简单透镜的焦距随波长的不同而有显著的变化。蓝光比绿光或红光的波长较短,其焦点离透镜也要近些。透镜不能将全部颜色的光聚于同一焦点上。在设计显微镜物镜时可将这种影响校正至一可实用的程度。校正的程度就每种类型的物镜来讲都是统一的。