

光镜与电镜

技术及具在水生生物上的应用

◎ 张东升 主编

非外借

中国农业科学技术出版社

光镜与电镜

技术及其在水生生物上的应用

◎ 张东升 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

光镜与电镜技术及其在水生生物上的应用 / 张东升主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2018. 8

ISBN 978-7-5116-3811-3

I. ①光… II. ①张… III. ①光学显微镜-应用-水生生物-研究②电子显微镜-应用-水生生物-研究 IV. ①Q17

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 168770 号

责任编辑 朱 绯

责任校对 李向荣

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106626 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82106626

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京建宏印刷有限公司

开 本 787mm×1 092mm 1/16

印 张 10.75

字 数 273 千字

版 次 2018 年 8 月第 1 版 2018 年 8 月第 1 次印刷

定 价 36.00 元



内容简介

第一篇介绍了光学显微镜物体成像的两大要素——光和透镜的基本知识，主要介绍了光的本质、光传播的基本特点，透镜的种类、性能、性质及其成像规律，晶体及光在其中的传播特性，此篇内容为理解第二篇中的几种光学显微镜成像原理奠定了基础。

第二篇介绍了几种常见光学显微镜的用途、成像原理、附件组成、使用方法，包括普通光学显微镜、相差显微镜、微分干涉显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜。此外，在普通光学显微镜部分增加了聚光器的正确使用方法和双目镜的调试方法。荧光显微镜部分增加了荧光物质的发光特点和染色条件及其使用范围。

第三篇介绍了从光学显微镜的分辨率极限到电镜分辨率进一步提升的基本知识，电镜电磁透镜的特性及电子显微镜的类型；之后着重介绍了两种基本类型的电子显微镜——透射电镜和扫描电镜的结构、成像原理、主要发展类型及应用；最后介绍了其在水生生物领域电镜研究的主要技术方法，包括透射电镜的超薄切片技术、负染色技术和冷冻电镜三维重构技术以及扫描电镜的生物样品制备技术。

第四篇主要介绍了荧光显微镜在水产养殖相关学科研究的一些实验技术，包括藻类细胞核的荧光观察、吖啶橙区分活细胞中的 DNA 和 RNA 的荧光组织化学方法、鱼类染色体的荧光观察、刺参体细胞滴片的间接免疫荧光及细菌的间接免疫荧光观察、水中细菌荧光计数方法。

第五篇介绍了水生生物领域的电镜实验技术，着重介绍了透射电镜和扫描电镜水生生物常规及特殊样品的制备技术。简要介绍了水生生物常见超微结构的观察和透射电镜观察方法。

本书为广大使用光学显微镜和电子显微镜的科研、教学、生产人员及学生等提供了更具系统性的使用技术参考书。

《光镜与电镜技术及其在水生生物上的应用》

编 委 会

主 编：张东升

副主编：周 玮 孙静娴

编 者：李亚娟 李 强

目 录

第一篇 基础知识

第一章 光	(3)
第一节 光的本质	(3)
第二节 光的传播	(4)
第三节 自然光与偏振光	(6)
第四节 光的干涉与衍射	(7)
第二章 光学透镜	(10)
第一节 透镜的种类	(10)
第二节 透镜的性能	(10)
第三节 透镜的性质	(13)
第四节 透镜成像规律	(15)
第三章 晶体及其透光特性	(17)
第一节 晶 体	(17)
第二节 晶体的折光特性及常见晶体的光学器件	(18)

第二篇 光学显微镜

第一章 普通光学显微镜	(25)
第一节 光学放大器件	(25)
第二节 照明器件	(28)
第三节 机械器件	(29)
第四节 显微镜的照明方式	(31)
第五节 显微镜的光轴调中	(33)
第六节 显微镜的光学参数	(34)
第二章 相差显微镜	(37)
第一节 相差显微镜光学原理	(37)
第二节 相差显微镜的结构特点	(37)
第三节 相差显微镜光路图	(39)
第四节 相差显微镜的使用范围、操作步骤及注意事项	(40)
第三章 微分干涉显微镜	(42)
第一节 微分干涉显微镜特殊光学元件	(42)

第二节	微分干涉显微镜光路图及其光学原理	(42)
第三节	微分干涉显微镜使用方法及其注意事项	(43)
第四章	暗视野显微镜	(45)
第一节	暗视野显微镜原理与结构	(45)
第二节	暗视场光挡的制作方法	(46)
第三节	暗视野显微镜的使用方法	(46)
第四节	暗视野显微镜使用时的注意事项	(47)
第五章	荧光显微镜	(48)
第一节	荧光物质	(48)
第二节	荧光显微镜结构特点及其原理	(51)
第三节	荧光显微镜的种类	(53)
第四节	荧光显微镜的使用方法	(54)
第五节	荧光显微镜使用中的注意事项	(54)
第六节	荧光显微镜标本制作要求	(55)
第七节	荧光图像的记录方法	(55)

第三篇 电镜技术

第一章	电子显微镜基础	(59)
第一节	光学显微镜的分辨极限	(59)
第二节	电子显微镜的分辨率	(61)
第三节	电磁透镜	(62)
第四节	电磁透镜的像差	(64)
第五节	电子显微镜的类型	(66)
第二章	透射电子显微镜	(67)
第一节	透射电子显微镜的发展简史	(67)
第二节	透射电子显微镜的基本结构	(68)
第三节	透射电镜的成像原理	(75)
第四节	冷冻电镜和球差色差校正透射电镜	(77)
第三章	扫描电子显微镜	(80)
第一节	扫描电子显微镜的发展简史	(80)
第二节	扫描电子显微镜的基本结构与成像原理	(80)
第三节	扫描电镜的主要性能与应用	(86)
第四节	环境扫描电镜	(87)
第四章	水生生物电镜研究的主要技术方法	(90)
第一节	超薄切片技术	(90)
第二节	负染色技术	(108)
第三节	冷冻电镜三维重构技术	(110)
第四节	扫描电子显微镜生物样品制备技术	(112)

第四篇 荧光显微镜在水产生物研究上的应用

实验一	藻类细胞核的荧光观察	(121)
实验二	吖啶橙区分活细胞 DNA 和 RNA 的荧光组织化学染色法	(123)
实验三	鱼类染色体的荧光观察	(125)
实验四	刺参体腔细胞滴片的间接免疫荧光	(128)
实验五	细菌滴片的间接免疫荧光	(131)
实验六	水中细菌荧光记数方法 (AODC 法)	(133)
实验七	水及沉积物中活细菌荧光计数方法	(135)

第五篇 水生生物电镜实验技术

第一章	透射电镜样品制备技术	(140)
实验一	常规生物样品超薄切片制备	(140)
实验二	微生物及游离细胞超薄切片制备	(142)
实验三	刺参体腔细胞的超薄切片制备	(143)
实验四	海绵超薄切片制备	(144)
实验五	浮游病毒的负染色样品制备	(146)
第二章	扫描电镜样品制备技术	(148)
实验六	常规生物扫描电镜样品制备	(148)
实验七	微生物及游离细胞扫描电镜样品制备	(149)
实验八	刺参体腔细胞的扫描电镜样品制备	(150)
第三章	水生生物超微结构及透射电镜观察	(152)
实验九	水生生物细胞常见超微结构观察	(152)
实验十	透射电镜观察	(152)
附录	常用缓冲液及其配制方法	(154)
参考文献		(161)

第一篇 基础知识

第一章 光

第一节 光的本质

简单地说，光是一种电磁波，具有波粒二象性。人们用波的特性解释光的传播，用粒子的特性解释光的能量变化。因此，光线具有正弦曲线图形，有波长、振幅、相位、频率（图 1-1-1）。

光的波长是指两个相邻波峰或波谷间的距离，波长的量度单位是纳米（nm），在 10~400 nm 的波为紫外光，380~780nm 为可见光，800nm 至 100 μ m 范围的光为红外光。可见光为普通光学显微镜所利用，可见光透过三棱镜可以呈现出红、橙、黄、绿、青、蓝、紫 7 种颜色，不同颜色光的波长范围分别为：红 770~622nm，橙 622~597nm，黄 597~577nm，绿 577~492nm，青 492~450nm，蓝 450~435nm，紫 435~390nm。紫外光为荧光显微镜所利用。

光的振幅是指光波的振动幅度，表示光波振动的强弱，光强与振幅的平方成正比。这里说的光强其实就是单位面积接收到的光波波动的能量，因此，光的振幅决定了光的强弱。

光的相位是指光波运动到某一个位点时的运动状态，是一个矢量，有方向、大小（图 1-1-1 中的 t 所示）。

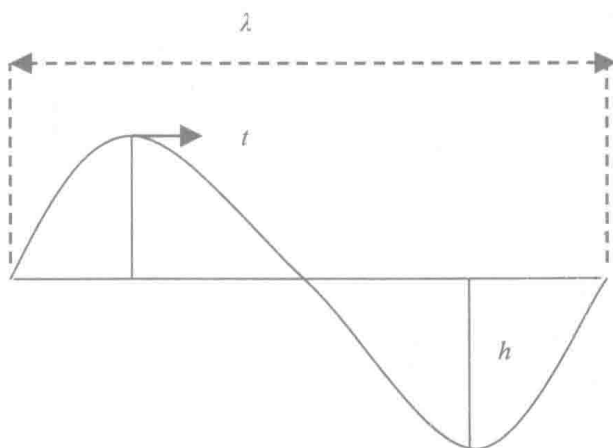


图 1-1-1 光线传播

λ : 波长, h : 振幅, t : 相位

光波频率: $\gamma = C/\lambda$;

式中, C 为光速, λ 为波长。

第二节 光的传播

光在均匀介质里以直线传播，光是横波（质点的振动方向与波的传播方向垂直），因此，它的振动方向与传播方向是垂直的，当光从一种介质传播到另一种介质时，会发生反射和折射。

1. 光的反射

当光从一种介质射向另一种介质的交界面时，一部分光返回原来介质中，使光的传播方向发生了改变，这种现象称为光的反射（图 1-1-2）。发生反射时，反射光线与法线的夹角叫做反射角。光反射时遵循反射定律。

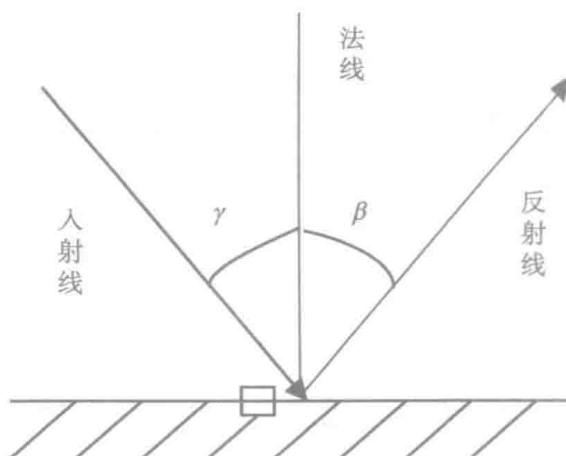


图 1-1-2 光的反射

γ : 入射角, β : 反射角

(1) 光的反射定律:

- 1) 反射光线、入射光线、法线都在同一平面内。(同平面)
- 2) 反射光线、入射光线分居法线两侧。(居两侧)
- 3) 反射角等于入射角。(角相等) ($\angle \gamma = \angle \beta$)

特殊情况: 垂直入射时, 入射角反射角都是零度, 法线、入射光线、反射光线合为一线。

(2) 光的两种反射现象:

镜面反射: 平行光线经界面反射后沿某一方向平行射出, 只能在某一方向接收到反射光线 (反射面是光滑平面)。

漫反射: 平行光经界面反射后向各个不同的方向反射出去, 即在各个不同的方向都能接收到反射光线 (反射面是粗糙平面或曲面)。

注意: 无论是镜面反射, 还是漫反射都遵循光的反射定律; 在光的反射中光路可逆。

2. 光的折射

光由一种介质斜射入另一种介质或在同一种不均匀介质中传播时, 方向发生偏折的现象叫作光的折射。发生折射时, 折射光线与法线的夹角, 叫折射角。光发生折射时遵循折射定律。

(1) 光的折射定律:

1) 入射光线, 折射光线, 法线在同一平面内, 折射光线和入射光线分别位于法线两侧 (图 1-1-3)。

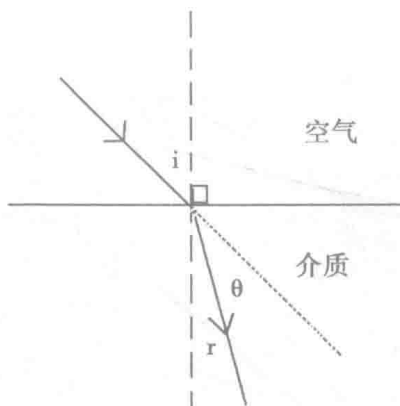


图 1-1-3 光的折射

i : 入射角, r : 折射角

2) 入射角的正弦和折射角的正弦成正比, 并且是一个常量。

根据光的折射定律, 光在发生折射时, 会有如下特征: 当光线从空气射入其他介质时, 入射角增大, 折射角也增大, 入射角大于折射角; 当光线从其他介质射入空气时, 则入射角小于折射角。光垂直入射时, 传播方向不变, 但光速改变。在光的折射中, 光路是可逆的。不同介质对光的折射能力是不同的。

(2) 折射率 (n): 分为绝对折射率和相对折射率。

1) 绝对折射率: 光从真空射入某介质时, 入射角正弦和折射角正弦的比, 称为该介质的折射率。用 n 表示。即 $n = \sin i / \sin r$ 。

除此公式以外, 还可以用波长来表示: $n = \lambda' / \lambda$ (λ' 为入射光线在真空传播时波长, λ 为折射光线所在介质的波长)。

也可以用速度之比表示: $n = c / v$ (c 为光在真空传播速度, v 为光在某介质中的传播速度)。

由于光在真空中传播的速度最大, 真空的折射率等于 1, 故其他介质的折射率都大于 1。同一介质对不同波长的光, 具有不同的折射率; 可见光在透明的介质中传播时, 折射率常随波长的减小而增大, 即红光的折射率最小, 紫光的折射率最大。通常所说某物体的折射率数值多少 (例如水为 1.33, 水晶为 1.55, 金刚石为 2.42, 玻璃按成分不同为 1.5~1.9), 是指对钠黄光 (波长 $5893 \times 10^{-10} \text{m}$) 而言。

2) 相对折射率: 光从介质 1 射入介质 2 发生折射时, 入射角 θ_1 与折射角 θ_2 的正弦之比 n_{21} 叫做介质 2 相对介质 1 的折射率, 即 “相对折射率”。因此, “绝对折射率” 可以看作介质相对真空的折射率。它是表示在两种 (各向同性) 介质中光速比值的物理量。

相对折射率公式: $n_{21} = \sin \theta_1 / \sin \theta_2 = n_2 / n_1 = v_1 / v_2$ 称为第二介质对第一介质的相对折射率。某介质的折射率也是该介质对真空的相对折射率。

第三节 自然光与偏振光

光波振动面：光的振动方向（光矢量方向）与光的传播方向构成的平面（图 1-1-4）。

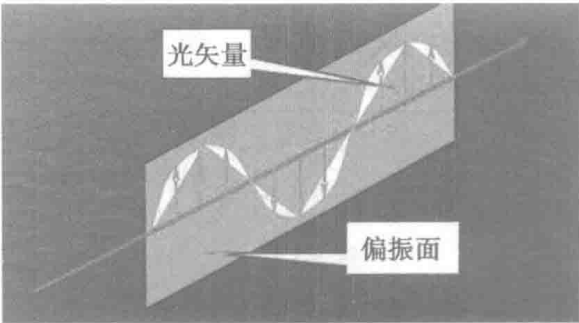


图 1-1-4 光的振动面

光源所发出的光是由大量彼此独立的原子所发出的单束光构成的复合光，它们会在光的振动面内的各个方向均不断振动且强度相等，这种性质的光称为自然光（图 1-1-5），即光矢量具有轴对称性、均匀分布、各方向振动的振幅相同，这种光就称为自然光。

光的振动面只限于某一固定方向的，叫做平面偏振光或线偏振光（图 1-1-6）。

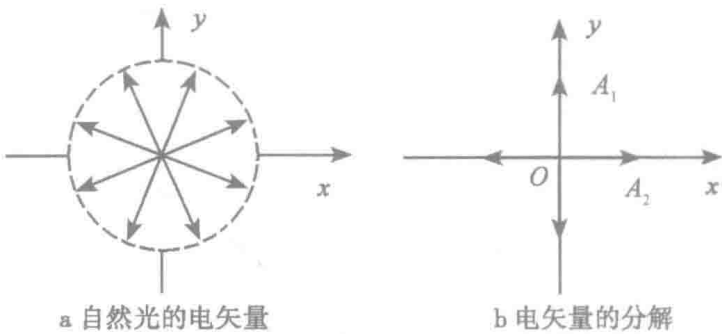


图 1-1-5 自然光及其分解

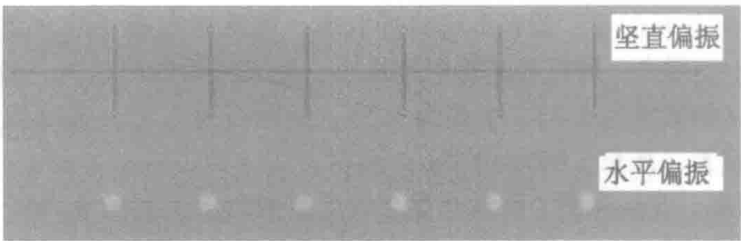


图 1-1-6 线偏振光

第四节 光的干涉与衍射

1. 光的干涉

两列或几列光波在空间相遇时相互叠加，在某些区域始终加强，在另一些区域则始终削弱，形成稳定的强弱分布的现象。干涉现象通常表现为光强在空间作相当稳定的明暗相间条纹分布（图 1-1-7，图 1-1-8）。

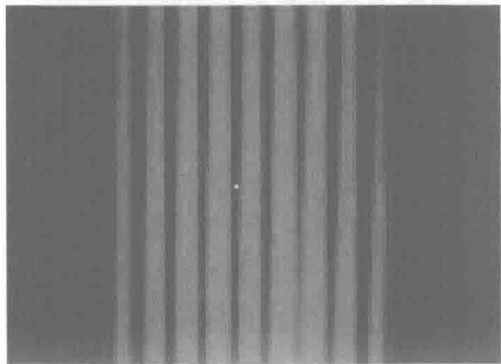


图 1-1-7 单色光的干涉条纹

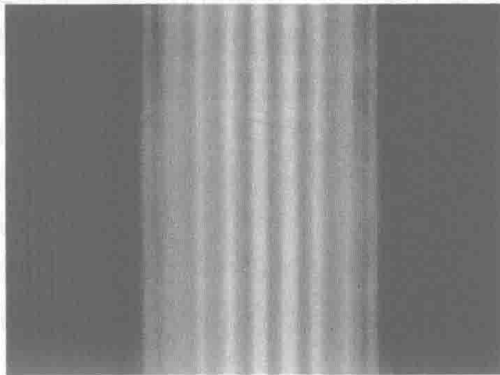


图 1-1-8 白光的干涉

(1) 光波的重叠原理：两波在同一介质中传播，相向行进而重叠时，重叠范围内介质的质点同时受到两个波的作用。若波的振幅不大，此时重叠范围内介质质点的振动位移等于各别波动所造成位移的矢量和，称为波的重叠原理。

(2) 光的干涉条件：只有两列光波的频率相同，相位差恒定，振动方向一致的相干光源，才能产生光的干涉。

(3) 获得相干光的方法：

1) 基本原理：把一个光源的一点发出的光束设法分为两束，然后再使它们相遇。

2) 两种基本方法：分波阵面法（如杨氏双缝干涉、洛埃镜、菲涅尔双面镜以及菲涅尔双棱镜）和分振幅法（如薄膜干涉、劈尖干涉、牛顿环和迈克尔逊干涉仪）。

(4) 干涉情况通常包括：

1) 双光波干涉：两个成员波的干涉。杨氏双孔和双缝干涉、菲涅耳双镜干涉及牛顿环等属于此类。双光波干涉形成的明暗条纹都不是细锐的，而是光强分布作正弦式的变化，这就是双光波干涉的特征。多光波干涉则可形成细锐的条纹。

2) 多光波干涉：多于两个成员波的干涉。

2. 光的衍射

光在传播路径中，遇到不透明或透明的障碍物，绕过障碍物，产生偏离直线传播的现象称为光的衍射。衍射时产生的明暗条纹或光环，叫衍射图样。

衍射产生条件：小孔或障碍物的尺寸比光波的波长小，或者跟波长差不多时，光才能发生明显的衍射现象。由于可见光波长范围为 $4 \times 10^{-7} \sim 7.7 \times 10^{-7} \text{ m}$ ，所以日常生活中很少见到明显的光的衍射现象，任何障碍物都可以使光发生衍射现象，但发生明显衍射现象的条件是“苛刻”的。

当障碍物的尺寸远大于光波的波长时，光可看成沿直线传播。注意：光的直线传播只是一种近似的规律，当光的波长比孔或障碍物小得多时，光可看成沿直线传播；在孔或障碍物可以跟波长相比，甚至比波长还要小时，衍射就十分明显。

包括：单缝衍射、圆孔衍射、圆板衍射及泊松亮斑。

(1) 单缝衍射 (图 1-1-9)：夫琅和费在 1821—1822 年间研究了观察点和光源距障碍物都是无限远 (平行光束) 时的衍射现象。所谓光源在无限远，实际上就是把光源置于第一个透镜的焦平面上，使之成为平行光束；所谓观察点在无限远，实际上是在第二个透镜的焦平面上观察衍射花样。在使用光学仪器的多数情况下，光束总是要通过透镜的，因而这种衍射现象经常会遇到，而且由于透镜的会聚，衍射花样的光强将比菲涅耳衍射花样的光强大大增加。当光传播到狭缝时，可把狭缝 S 看成许多个点光源，这些点光源发出的光在空间传播相遇叠加决定了屏幕上各点位置的明暗情况。

单缝衍射条纹的特征 (单色光的衍射图样)：

①中央亮纹宽而亮。②两侧条纹具有对称性，亮纹较窄、较暗 (图 1-1-9)。③波长一定时，单缝窄的中央条纹宽，各条纹间距大 (图 1-1-10)。④单缝不变时，光波波长越长的 (红光) 中央亮纹越宽，条纹间隔越大。⑤白炽灯的单缝衍射条纹为中央亮两侧为彩色条纹，且外侧呈红色，靠近光源的内侧为紫色 (图 1-1-11)。

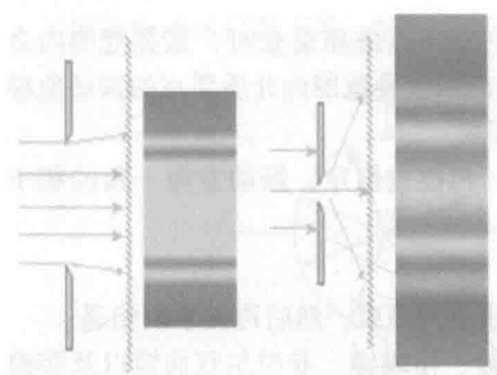


图 1-1-9 单缝衍射

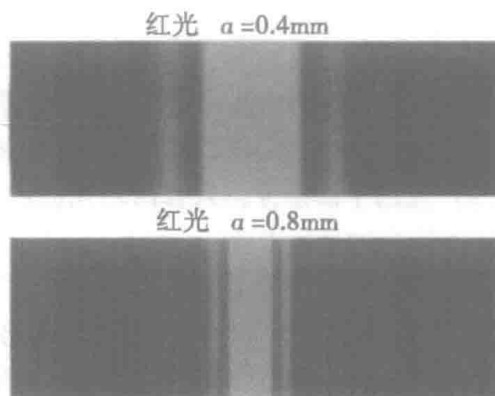


图 1-1-10 不同缝宽的单色光的衍射条纹

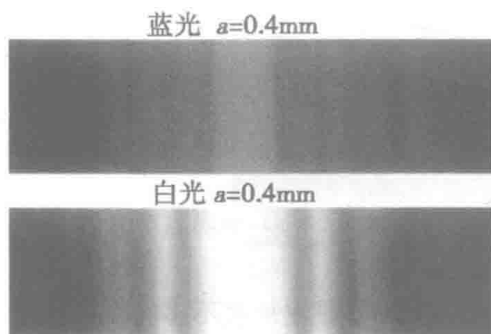


图 1-1-11 相同缝宽不同色光的衍射条

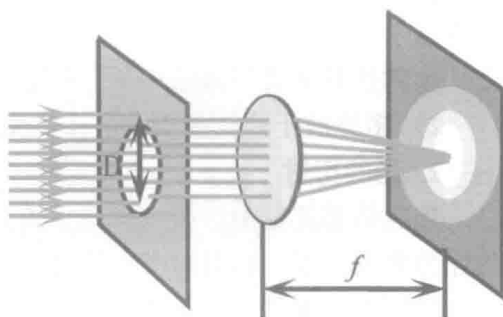


图 1-1-12 圆孔衍射

(2) 圆孔衍射：如果在观察单缝衍射的装置中，用一小圆孔代替狭缝，仍以激光为光源，那么在透镜的焦平面上可得圆孔衍射花样（图 1-1-12）。（也可以说当光线经过一个较大的孔时，光沿直线传播，阴影区和亮区边界清晰，逐渐减小圆孔大小，当圆孔减小到一定程度时出现环状明暗相间同心圆的衍射图样）。

圆孔衍射特点：屏上可见同心圆环，屏沿轴向移动，圆环中心明暗交替变化。

(3) 圆屏衍射（泊松亮斑）：在平面波或球面波的传播方向垂直放置一不透明的圆屏，当圆屏的线度与波长可比拟时，光可以绕过障碍物进入阴影区，在几何照明区内出现明暗相间的圆环，这类衍射称为菲涅耳圆屏衍射，简称圆屏衍射。

圆屏衍射特点：屏上可见同心圆环，屏沿轴向移动，圆环中心永远是亮点（图 1-1-13、图 1-1-14）。

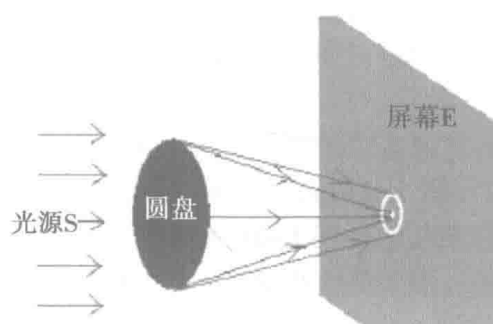


图 1-1-13 圆屏衍射

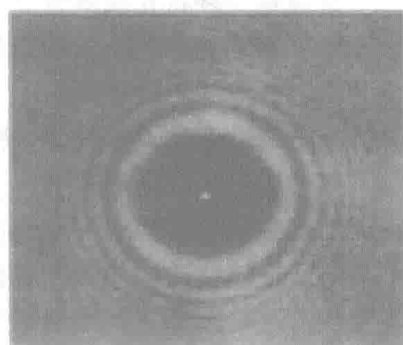


图 1-1-14 泊松亮斑