

# 特殊生物显微镜的原理与使用

南昌大学生物学实验教学中心

主讲：邓为科

# 显微镜种类

## 光学显微镜

- ☞ 倒（正置）置显微镜
- ☞ 体视显微镜
- ☞ 金相显微镜
- ☞ 偏光显微镜
- ☞ 相差显微镜
- ☞ 干涉显微镜
- ☞ 微分干涉对比显微镜（DIC）
- ☞ 倒置（正置）荧光显微镜
- ☞ 数码显微镜

## 电子显微镜

- ☞ 扫描隧道显微镜（STM）
- ☞ 扫描电子显微镜（SEM）  
（反射）
- ☞ 透射电子显微镜（TEM）
- ☞ 发射式电子显微镜



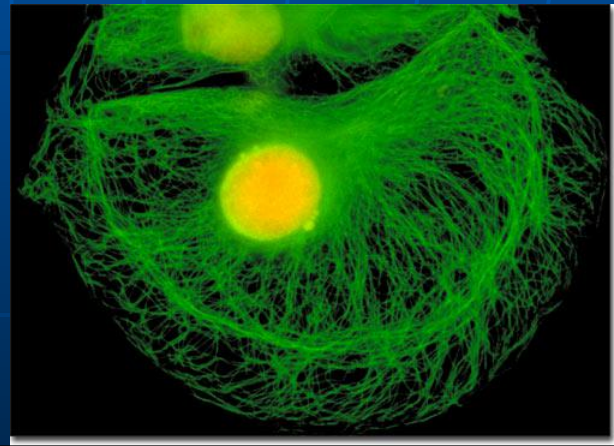
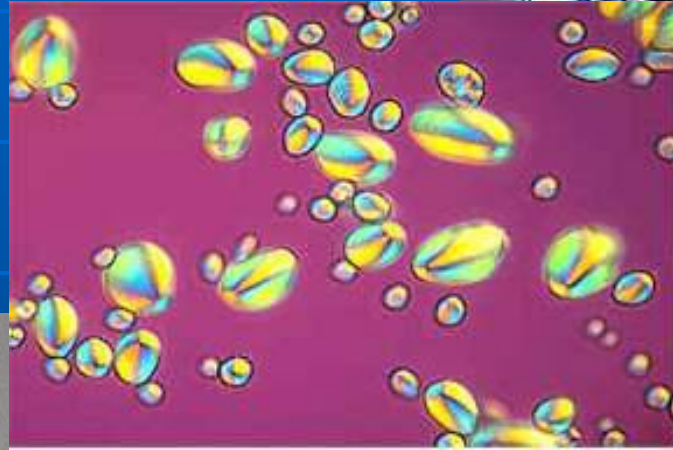
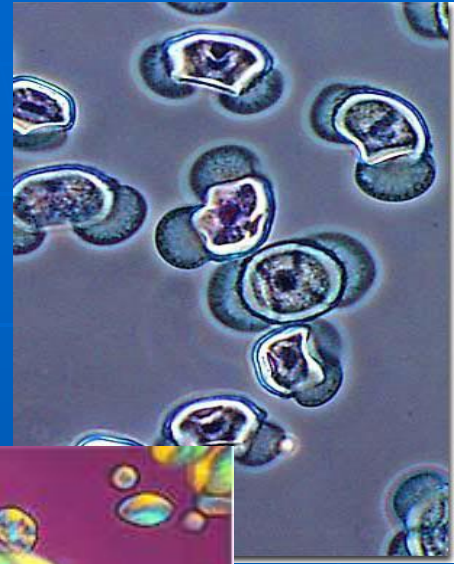
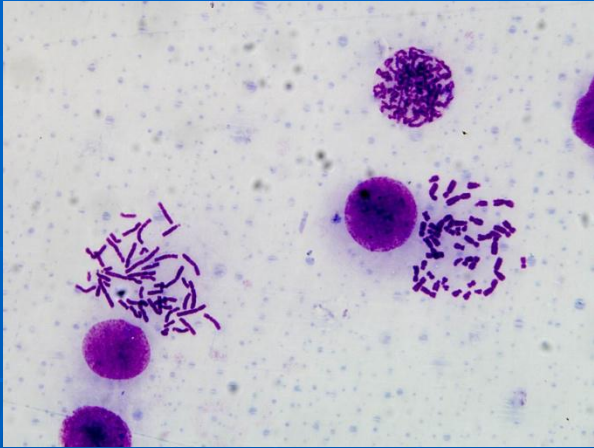
**Fig.1** 正置显微镜



**Fig.2** 倒置显微镜



**Fig.3** 体视显微镜



## 要知道的几个重要的分辨率

- 人眼：0.2mm/250mm
- 光学显微镜：0.2 $\mu$ m
- 电子显微镜：0.2nm

# 1.显微镜的发展

1.1 人眼：人眼观察物体的能力是有限的。一般的情况下，在25cm的明视距离内，人眼只能分辨相距0.1-0.2mm的两个物体。也就是说，当两个物体相距不到0.1mm的时候，人眼就会把它们看成是一个物体了。这个极限便称为人眼的分辨本领。

人眼视锥细胞直径为4微米，对应的视角约为30秒，这个角度就是视角的极限。一般要能清晰的分辨两个点，视角须在1分以上。高1米的物体距眼睛3400米时，视角为1分。

1.2 放大镜：约在四百年前眼镜片工匠们开始磨制放大镜。当时的放大镜的放大倍数只有3—5x

1.3 显微镜：

1590年，荷兰和意大利的眼镜制造者造出类似显微镜的放大仪器。

1673~1677年期间，列文胡克制成单组元放大镜式的高倍显微镜

19世纪70年代，德国人阿贝奠定了显微镜成像的古典理论基础。

1850年出现了偏光显微术；

1893年出现了干涉显微术；

1935年荷兰物理学家泽尔尼克创造了相衬显微术，



詹森父子制造  
的第一台显微镜  
(约1595年)



# Hooke Microscope circa 1670

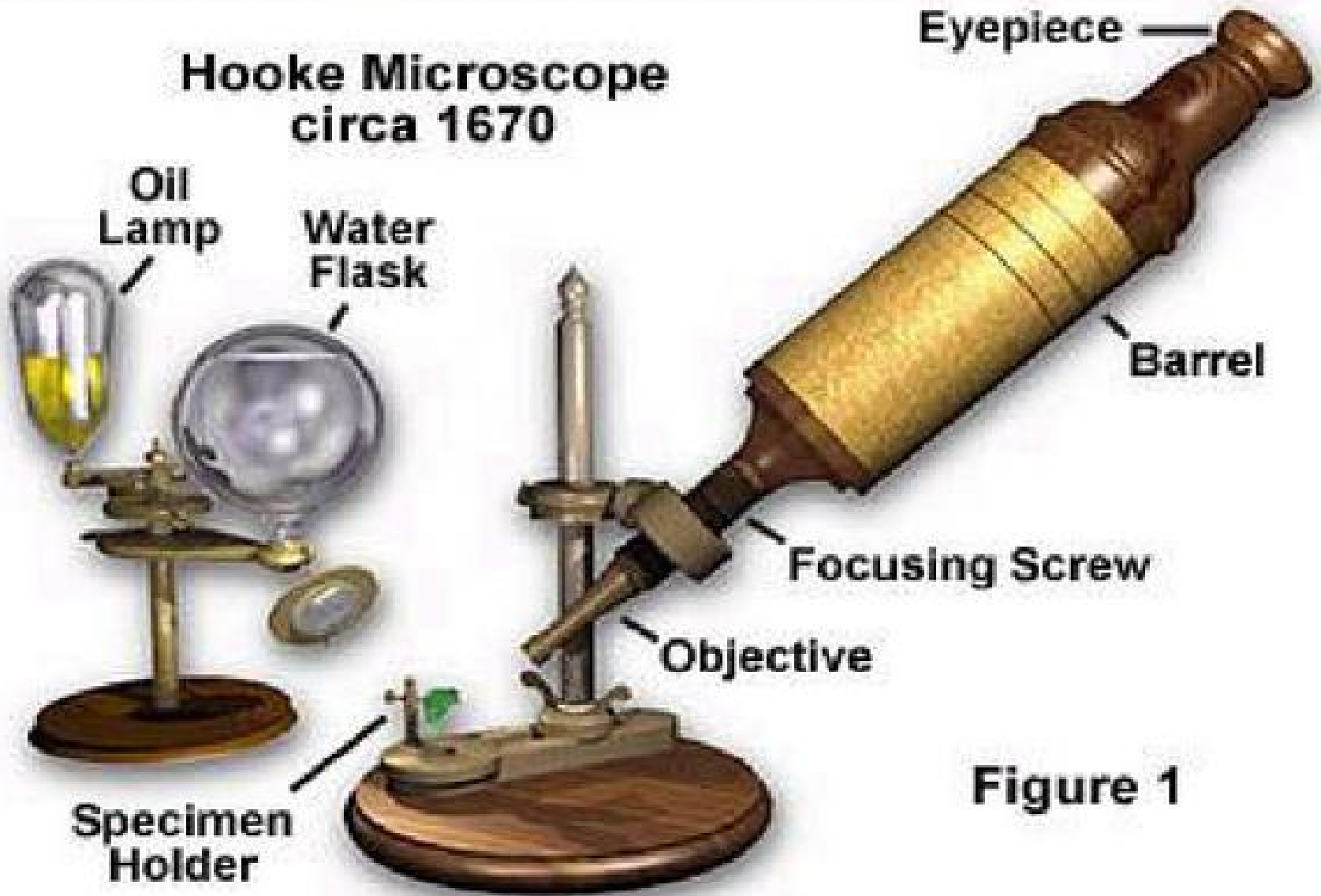


Figure 1

罗伯特·虎克制造的显微镜（1665）放大倍数：140倍

# 显微镜的结构





### 光学显微镜基本结构:

1. 照明灯(Lamp)
2. 聚光器(Condenser)
3. 载物台和切片夹  
(Mechanical stage and specimen retainer)
4. 推进器(Mechanical stage adjustment knob)
5. 物镜(Objectives)
6. 粗细螺旋(Course and fine focus knob)
7. 目镜(Oculars)
8. 照相机等接口  
(Connection to camera, etc.)

# 主要内容

- 相差显微镜
- 荧光显微镜

# 相差显微镜

## 2.1 原理

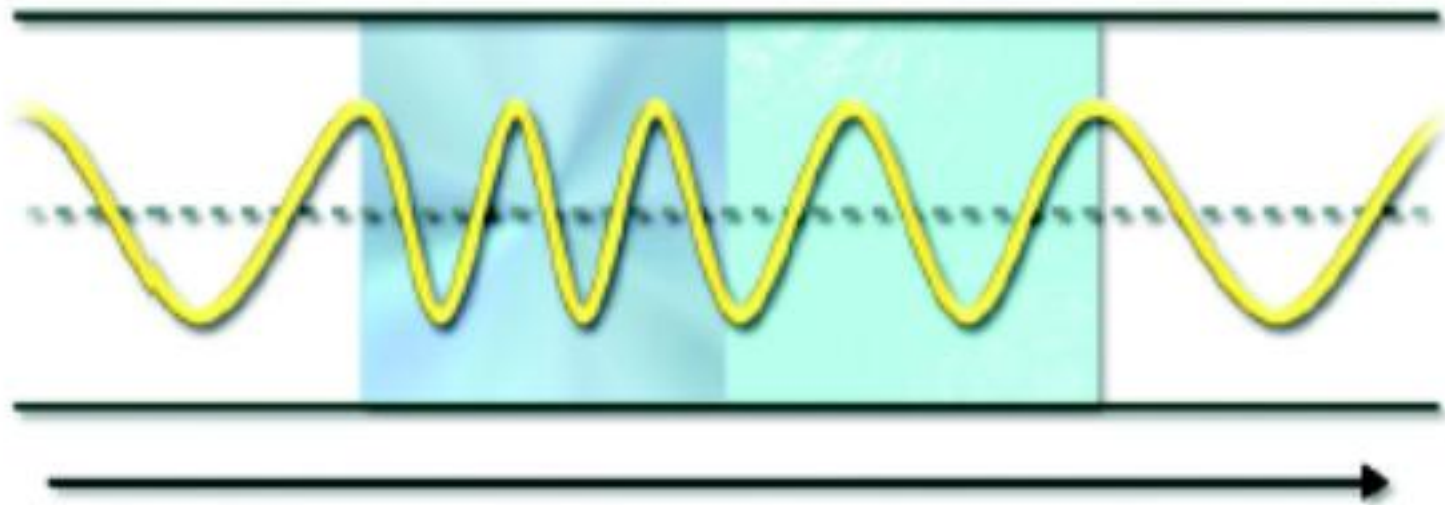
- 光波有振幅（亮度）、波长（颜色）及相位（指在某一时间上光的波动所能达到的位置）的不同。
- 当光通过物体时，如波长和振幅发生变化，人们的眼睛才能观察到，这就是普通显微镜下能够观察到染色标本的道理。而活细胞和未经染色的生物标本，因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同，光波通过时，波长和振幅并不发生变化，仅相位有变化（相应发生的差异即相位差），而这种微小的变化，人眼是无法加以鉴别的，故在普通显微镜下难以观察到。

**Air**  
R.I. = 1.0

**Glass**  
R.I. = 1.5

**Water**  
R.I. = 1.37

**Air**  
R.I. = 1.0



- 相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位，并且利用光的衍射和干涉现象，把相位差变成振幅差(明暗差)，同时它还吸收部分直射光线，以增大其明暗的反差。因此可用以观察活细胞或未染色标本。

## 2.2 结构特点

- 相差显微镜与普通显微镜的主要不同之处是：用环状光阑代替可变光阑，用带相位板的物镜(通常标有PH的标记)代替普通物镜，并带有一个合轴调节用的望远镜。
- 环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑，它们的直径和孔宽是与不同的物镜相匹配的。

- 相位板安装在物镜的后焦面处，相板装有吸收光线的吸收膜和推迟相位的相位膜。它除能推迟直射光线或衍射光的相位以外，还有吸收光使亮度发生变化的作用。
- 调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时，聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上，必需调节光阑的亮环和相板的环状圈重合（共轭重合），才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱，应被吸收的光不能吸收，该推迟相位的光波不能推迟，就失去了相差显微镜的作用。



# 相差附件



## 2.3使用方法

### (1) 相差装置的调换安装

卸下普通显微镜使用的聚光器，将环状光阑装在聚光器支架上，把绿色滤光片放在上面，它可吸收红色和蓝色光，使波长范围小的单色光线进行照明，并有吸热作用，能使相差观察获得良好的效果。再从转换器上旋下普通物镜，换上相差物镜。

### (2) 调焦

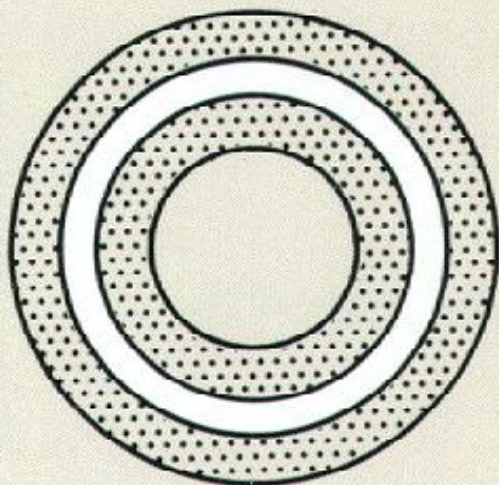
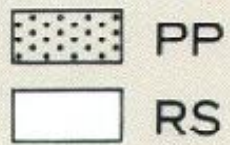
打开光源，旋转集光器转盘，将“0”对准标示孔，使普通聚光器部分进入光路。先使用低倍相差物镜，按普通显微镜操作方法进行对光和调焦。旋转环状光阑，使光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应，如相差物镜为40X时应用40X标示孔的光阑。

### (3) 合铀调整

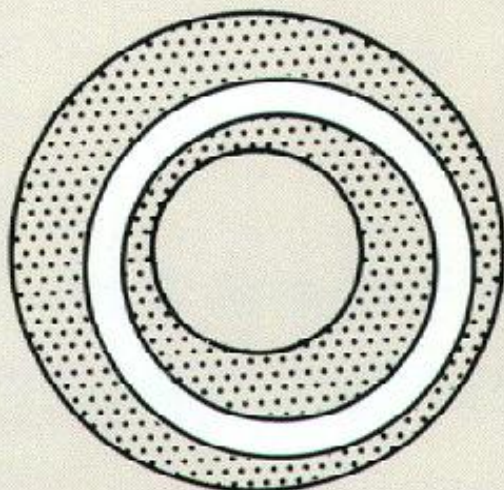
拔出目镜，插入合铀望远镜，一边从望远镜向内观察，并用左手固定其外筒；一边用右手转动望远镜内筒使其上升，当对准焦点就能看到环状光阑的亮环和相板的暗环，此时可将望远镜固定住。再升降集光器并调节其下的螺旋使亮环的大小与暗环一致，然后左右前后调节环状光阑聚光器上的调节钮，使两环完全重合。

### (4) 观察

换回目镜，按常规要领进行观察。在更换不同倍率的相差物镜时，每一次都要使用相匹配的环状光阑。



调中好



PP · RS偏心

# 相差调节

## 2.4用途

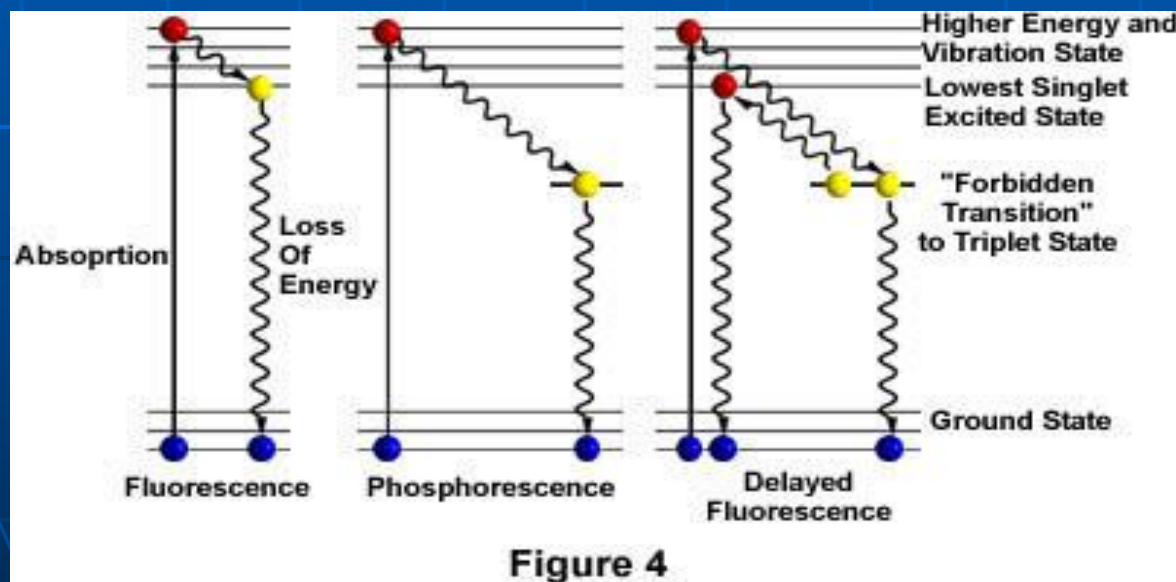
用于观察组织培养中活细胞形态结构。活细胞无色透明，一般光镜下不易分辨细胞轮廓及其结构，组织培养研究常用的是倒置相差显微镜。

## 二、荧光显微镜

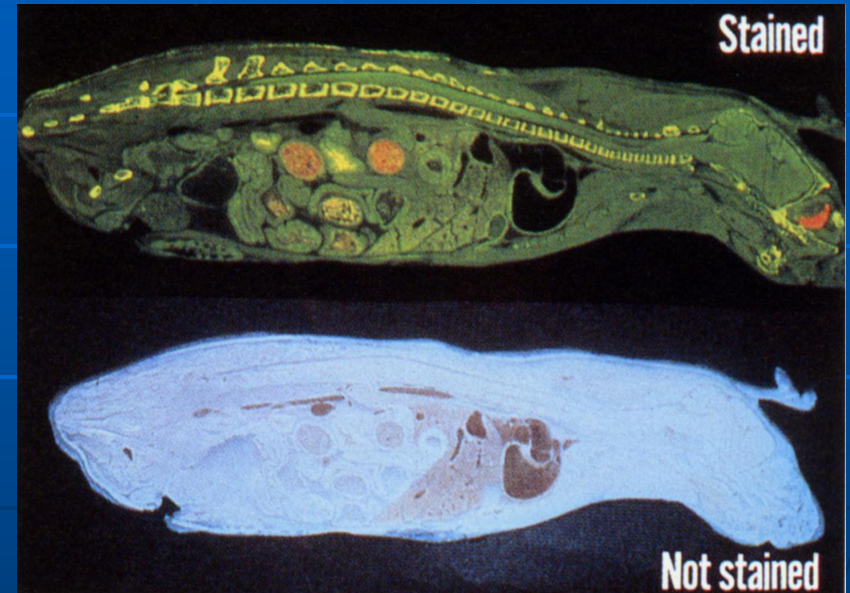
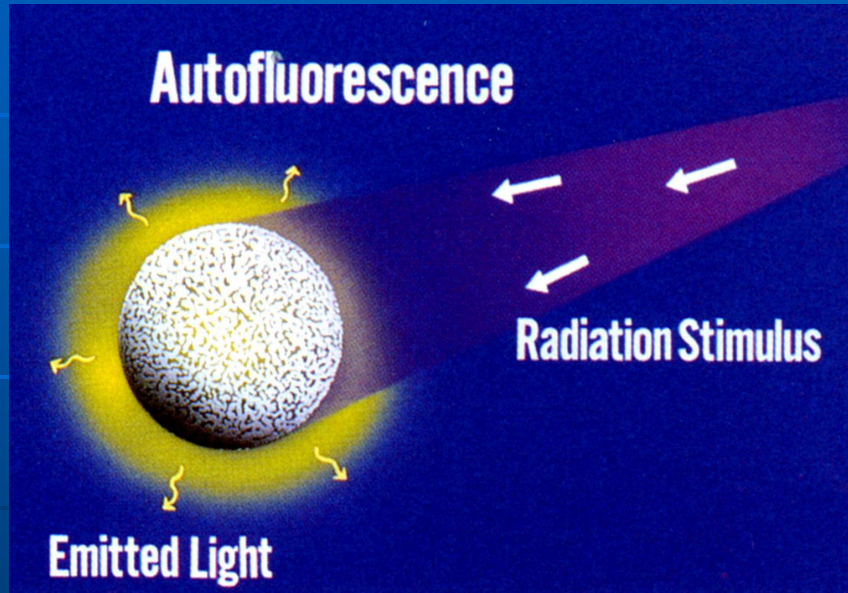
### 一、原理

- 荧光显微镜是利用一个高发光效率的点光源，经过滤色系统发出一定波长的光(如紫外光3650入或紫蓝光4200入)作为激发光、激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后，再通过物镜和目镜的放大进行观察。这样在强烈的对衬背景下，即使荧光很微弱也易辨认，敏感性高，主要用于细胞结构和功能以及化学成分等的研究。
- 荧光显微镜的基本构造是由普通光学显微镜加上一些附件(如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等)的基础上组成的。

- 什么是荧光：物质中的电子吸收光的能量由低能状态转变为高能状态，再回到低能状态时释放出的光，是非温度辐射光——冷光。即：物质吸收短波光，发射出的长波光。
- 显微镜荧光利用光源激发——光化荧光



- 荧光的种类：
  - 自发荧光（固有荧光）
  - 二次荧光





- 荧光的性质:

吸收光, 必需有激发光源

荧光波长  $>$  激发波长 (损失热能)

荧光强度极小于激发光的强度

有不同程度的衰减

荧光强度取决于激发光强度、被检物浓度、  
荧光效率

## 二、荧光显微镜的种类：

透射式  
落射式



Fig.14 透射式荧光显微镜



Fig.15 落射式荧光显微镜

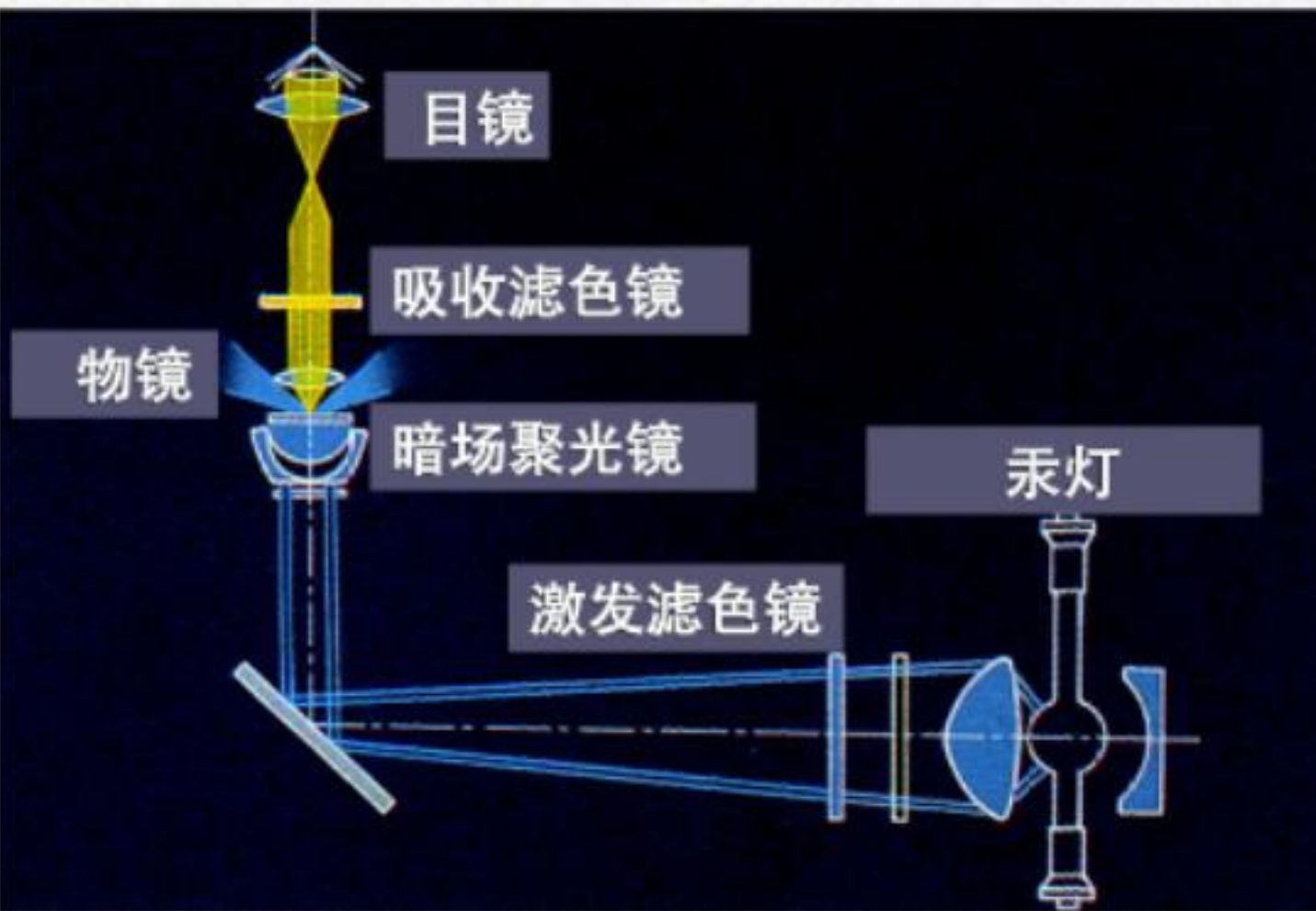


Fig.16 透射式荧光显微镜光路原理图

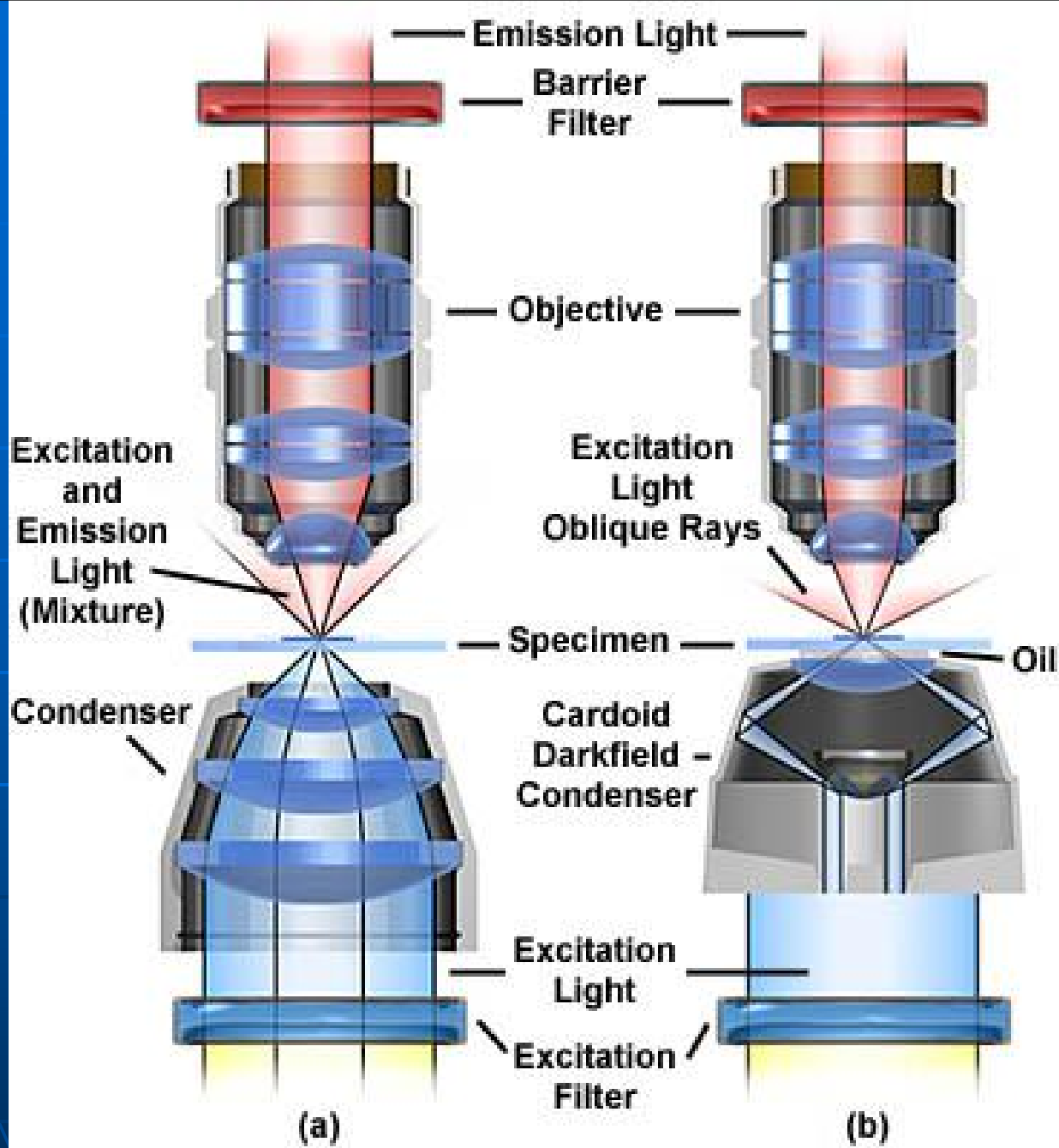


Figure 1

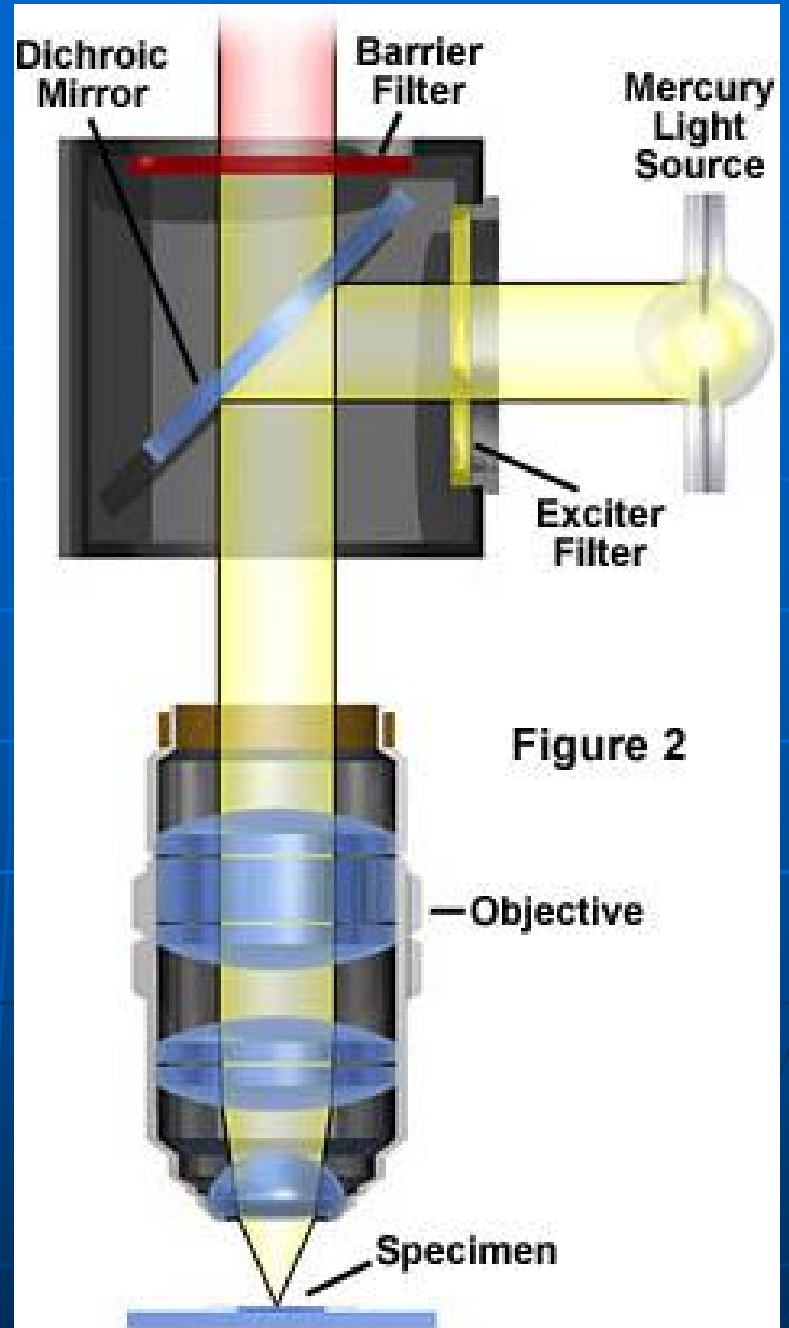


Figure 2

## 三、荧光显微镜主要部件

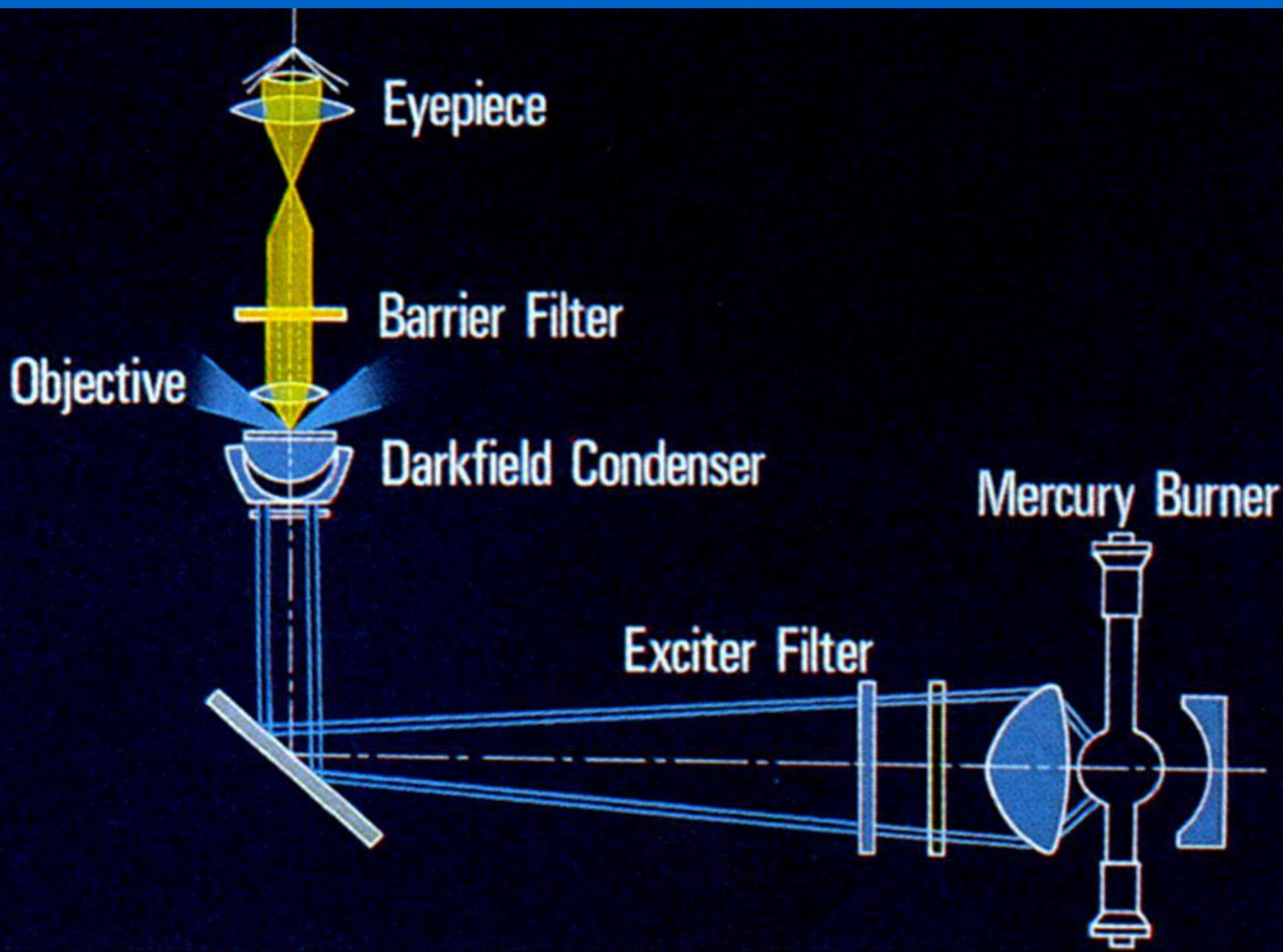
### 透射式

- 汞灯光源
- 激发滤色镜
- 吸收滤色镜
- 暗场聚光镜

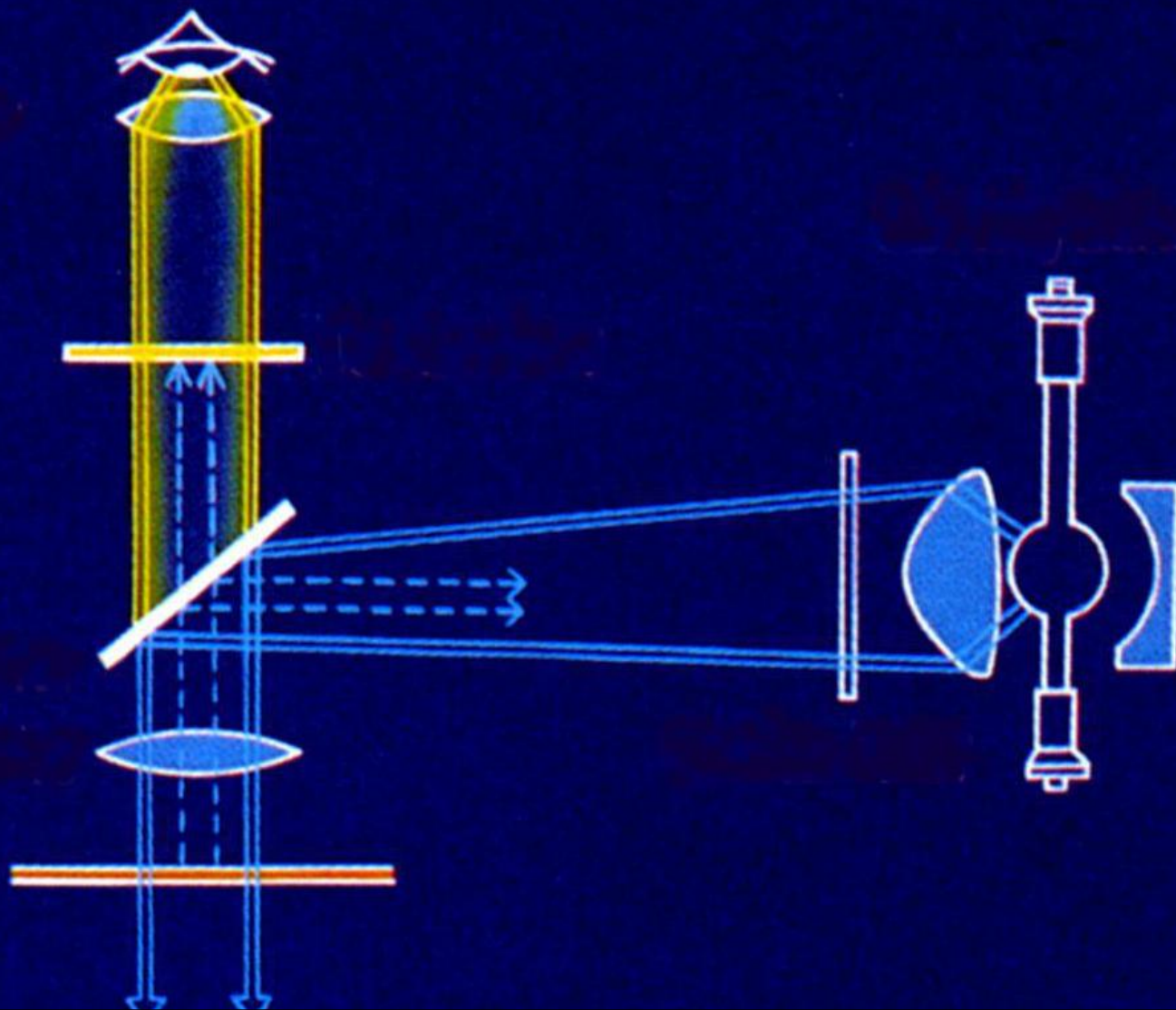
### 落射式

- 汞灯光源
- 激发滤色镜
- 分色镜
- 吸收滤色镜

# 透射荧光显微镜光路图



# 落射荧光显微镜光路图



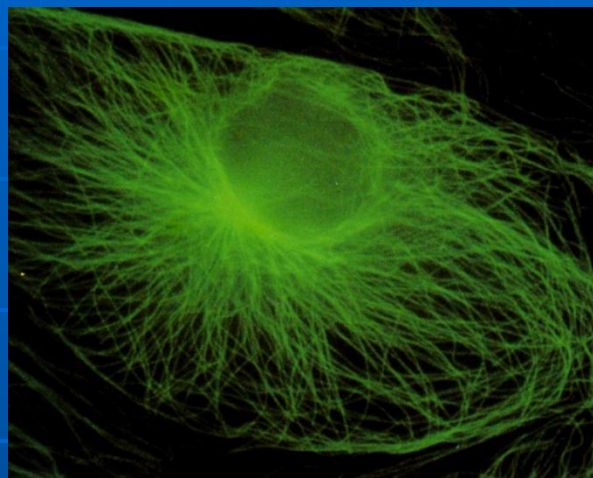


# 双重染色标本的单色和双色观察

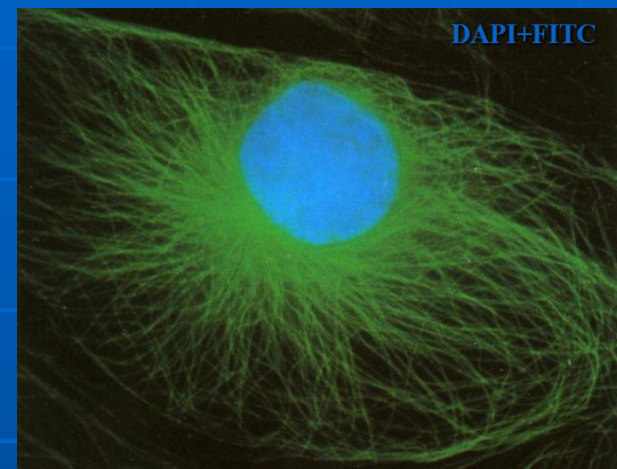
WU



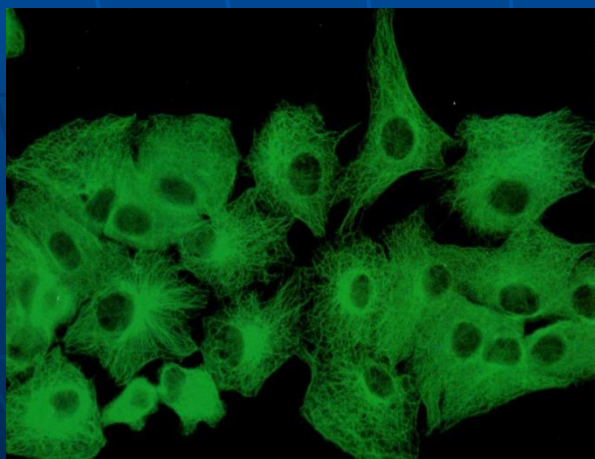
WIB



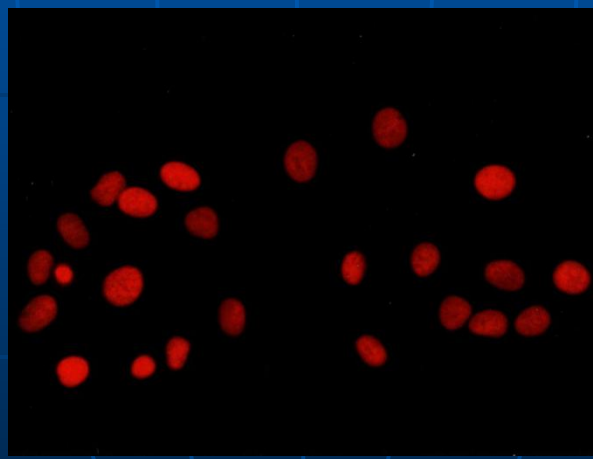
DUAL BAND



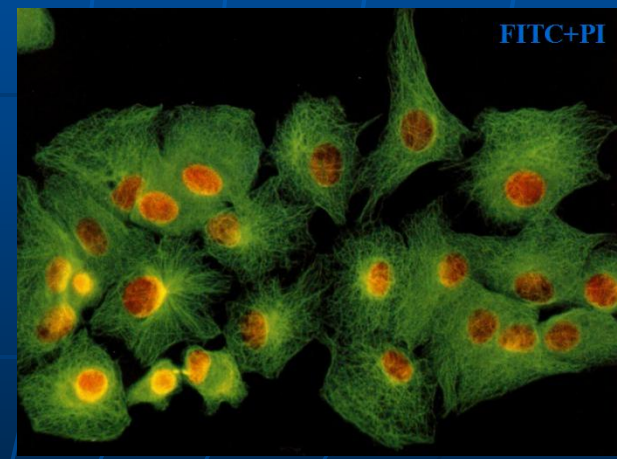
WIBA



WIG



WIB



- 荧光光源 一般采用超高压汞灯(50—200W)，它可发出各种波长的光，但每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长，所以需加用激发滤片（一般有紫外、紫色、蓝色和绿色激发滤片），仅使一定波长的激发光透过照射到标本上，而将其他光都吸收掉。
- 每种物质被激发光照射后，在极短时间内发射出较照射波长更长的可见荧光。荧光具有专一性，一般都比激发光弱，为能观察到专一的荧光，在物镜后面需加阻断滤光片。它的作用有二：一是吸收和阻挡激发光进入目镜、以免干扰荧光和损伤眼睛。二是选择并让特异的荧光透过，表现出专一的荧光色彩。两种滤光片必须选择配合使用。

#### 四、使用方法.

1. 打开灯源，超高压汞灯要预热几分钟才能达到最亮点。

2. 透射式荧光显微镜需在灯源与聚光器之间装上所要求的激发滤片，在物镜的后面装上相应的阻断滤片。

落射式荧光显微镜需在光路的插槽中插入所要求的激发滤片 / 双色束分离器 / 阻断滤片的插块。

3. 放置标本片，调焦后即可观察。使用中应注意：未装滤光片不要用眼直接观察，以免引起眼的损伤；

4. 高压汞灯关闭后不能立即重新打开，需经5分钟后才能再启动，否则会不稳定，影响汞灯寿命。

## 五、用途

- 1 观察标本中的自发荧光物质或以荧光素染色或标记的细胞和结构
- 2 标本中的荧光物质在紫外线激发下产生各种颜色的荧光，借以研究该荧光物质在细胞和组织内的分布。组织中的自发性荧光物质如神经细胞和心肌细胞等内的脂褐素呈棕黄色荧光，肝贮脂细胞和视网膜色素上皮细胞内的维生素A呈绿色荧光，某些神经内分泌细胞和神经纤维内的单胺类物质（儿茶酚胺、5-羟色胺、组胺等）在甲醛作用下呈不同颜色的荧光，组织内含有的奎宁、四环素等药物也呈现一定的荧光。

3 细胞内的某些成分可与荧光素结合而显荧光，如溴化乙锭与吖啶橙可与DNA综合，进行细胞内DNA含量测定。

4 荧光显微镜更广泛用于免疫细胞化学研究，即以异硫氰酸或罗丹明等荧光素标记抗体（一抗或二抗），用该标记抗体直接或间接地与细胞内的相应抗原结合，以检测该抗原的存在与分布。

## 三、试剂与器材

鱼、草履虫、甲醇、5% 丫啶橙、滤纸、吸管、载玻片、  
荧光显微镜、暗视野显微镜、普通光学显微镜

## 四、实验内容和实验步骤

1. 鱼血细胞染色观察：取少许鱼血 → 常规血涂片 → 凉干 → 甲醇固定**10 min** → **5%** 丫啶橙染色**5 min** → 水洗 → 室温干燥（滤纸擦干玻片底面） → 荧光显微镜观察（先低倍后高倍观察）（可在同一玻片上观察未荧光染色的血细胞）
2. 取洋葱 → 撕取一小片内表皮 → 平面单层铺展于玻片上 → 室温凉干 → **1%** 丫啶橙染色**5min** → 水洗（用吸管，小心掉片） → 室温干燥（或用滤纸擦干） → 荧光显微镜观察



# 作业

- 制作低倍镜和高倍镜观察用的中央遮光板。
- 为什么说倒置、相差显微镜是观察培养活细胞的最有效显微镜？
- 荧光显微镜的两种滤光片各起什么作用？

# 倒置显微镜 inverse microscope



# 显微操作仪

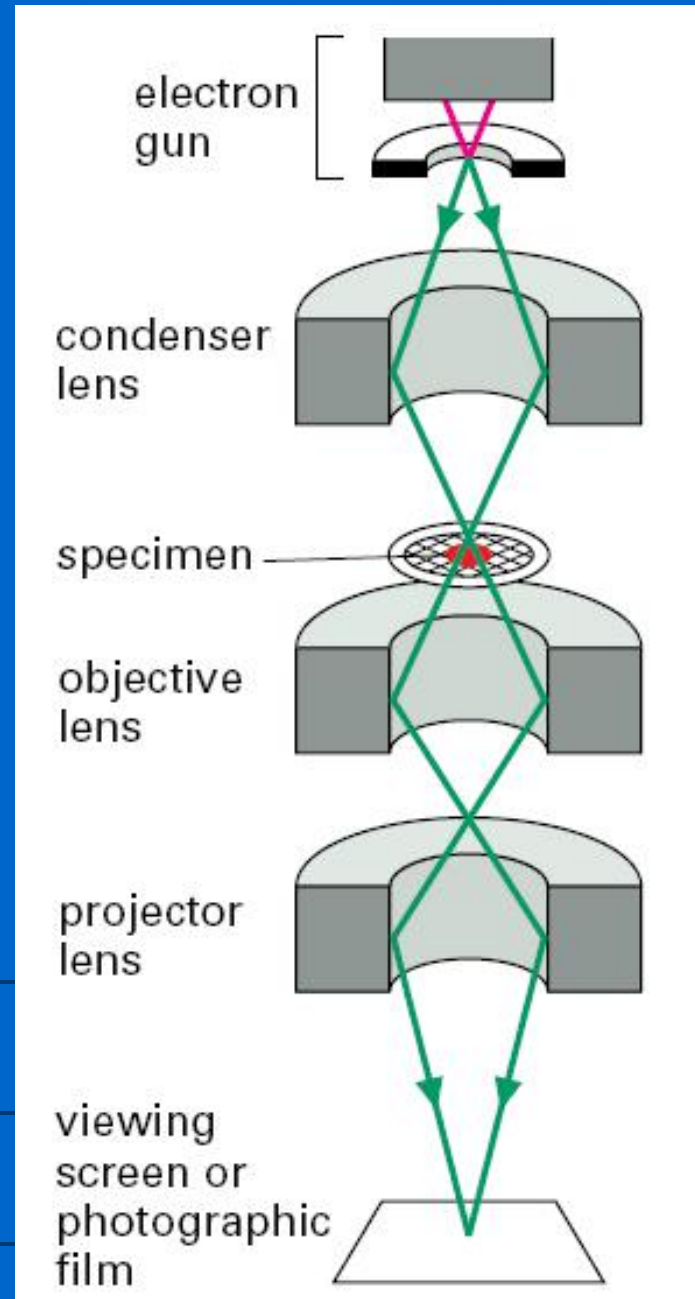


# 转基因显微操作过程

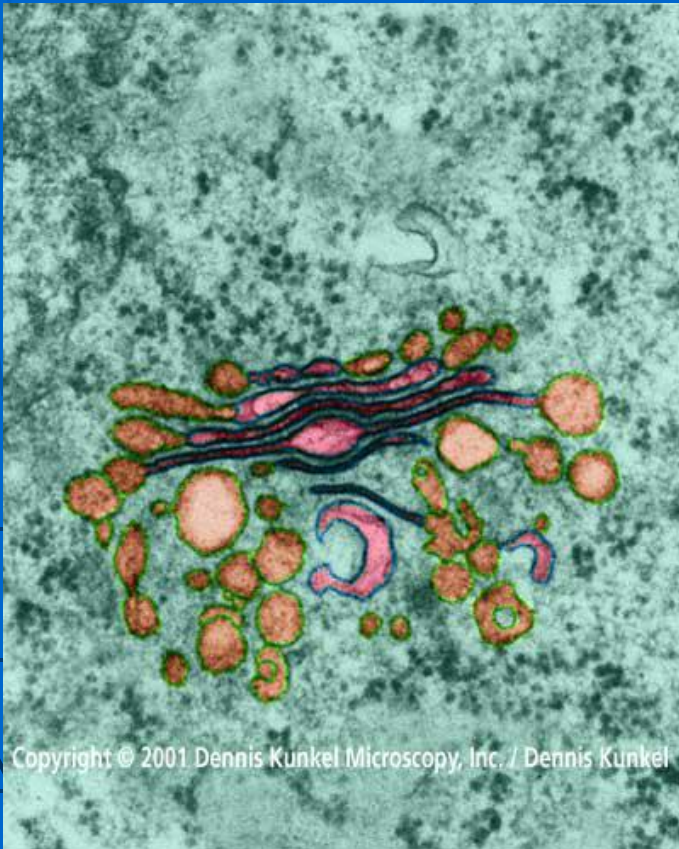


# 透射电子显微镜 TEM

## TEM LIGHT PATHWAY



# TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE, TEM



# 扫描电子显微镜 SEM

