

## 光学显微镜的几种特殊显微镜

### 一. 暗视野显微镜

暗视野显微镜由于不将透明光射入直接观察系统，无物体时，视野暗黑，不可能观察到任何物体，当有物体时，以物体衍射回的光与散射光等在暗的背景中明亮可见。在暗视野观察物体，照明光大部分被折回，由于物体(标本)所在的位置结构，厚度不同，光的散射性，折光等都有很大的变化。

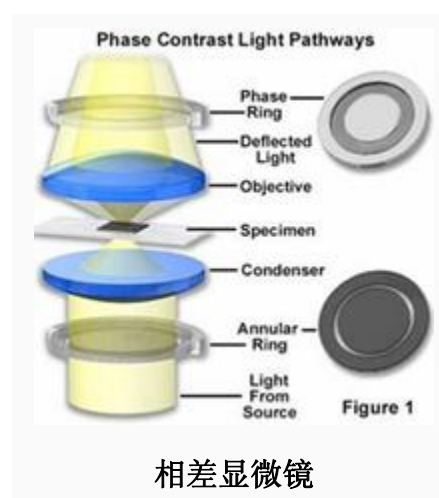
暗视野显微镜在普通光学显微镜台下配一个暗视野聚光器,来自下面光源的光线被抛物面聚光器反射,形成了横过显微镜视野而不进入物镜的强烈光束。因此视野是暗的,视野中直径大于 0.3 $\mu$ m 的微粒将光线散射,其大小和形态可清楚看到。甚至可看到普通明视野显微镜中看不见的几个毫微米的微粒。因此在某些细菌、细胞等活体检查中常常使用。

### 二. 相位差显微镜

相差显微镜是荷兰科学家 Zernike 于 1935 年发明的,用于观察未染色标本的显微镜。活细胞和未染色的生物标本,因细胞各部细微结构的折射率和厚度的不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位发生变化(振幅差),这种振幅差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差,并利用光的衍射和干涉现象,把相差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本。相差显微镜和普通显微镜的区别是:用环状光阑代替可变光阑,用带相板的物镜代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能:①将直射的光(视野中背景光)与经物体衍射的光分开;②将大约一半的波长从相位中除去,使之不能发生相互作用,从而引起强度的变化。

相差显微镜(phasecontrast microscope)由 P. Zernike 于 1935 年发明,并因此获 1953 年诺贝尔物理奖。这种显微镜最大的特点是可以



相差显微镜

观察未经染色的标本和活细胞。

相差显微镜的基本原理是，利用物体不同结构成分之间的折射率和厚度的差别，把通过物体不同部分的光程差转变为振幅（光强度）的差别，经过带有环状光阑的聚光镜和带有相位片的相差物镜实现观测的显微镜。主要用于观察活细胞或不染色的组织切片，有时也可用于观察缺少反差的染色样品。

把透过标本的可见光的光程差变成振幅差，从而提高了各种结构间的对比度，使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射，偏离了原来的光路，同时被延迟了  $1/4\lambda$ （波长），如果再增加或减少  $1/4\lambda$ ，则光程差变为  $1/2\lambda$ ，两束光合轴后干涉加强，振幅增大或减小，提高反差。在构造上，相差显微镜有不同于普通光学显微镜两个特殊之处：

1. 环形光阑（annular diaphragm）位于光源与聚光器之间，作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥，聚焦到标本上。

2. 相位板（annular phaseplate）在物镜中加了涂有氟化镁的相位板，可将直射光或衍射光的相位推迟  $1/4\lambda$ 。分为两种：

1. A+相板：将直射光推迟  $1/4\lambda$ ，两组光波合轴后光波相加，振幅加大，标本结构比周围介质更加变亮，形成亮反差（或称负反差）。

2. B+相板：将衍射光推迟  $1/4\lambda$ ，两组光线合轴后光波相减，振幅变小，形成暗反差（或称正反差），结构比周围介质更加变暗。

相差显微镜使用中的几个问题：

- （1）相位倒转 当  $n' < n$  或  $n' > n$  时得到象的明暗反差正好相反，称为相位倒转。当相位差  $\delta = 0$  时是无法识别的，随着  $\delta$  的增大反差变大，当  $\delta$  继续增大到某一值后会出现相位倒转。用 90%高吸光值（高反差）物镜时，这个转变值约为  $0.55\lambda$ ，用 70%标准吸光值的物镜时约为  $0.33\lambda$ 。较高吸光值的物镜应该用于分辨较小的光程差。

- （2）晕轮和渐暗效应 在相差显微镜成象过程中，某一结构由于相位的延迟而变暗时，并不是光的损失，而是光在象平面上重新分配的结果。因此在黑暗区域明显消失的光会在较暗物体的周围出现一个明亮的晕轮。这是相差显微镜的缺点，它妨碍了精细结构的观察，当环状光阑很窄时晕轮现象更为严重。相差显微镜的另一个现象是渐暗效应，指相差观察相位延迟相同的较大区域时，该区域边

缘会出现反差下降。

(3) 样品厚度的影响 当进行相差观察时，样品的厚度应该为  $5\mu\text{m}$  或者更薄，当采用较厚的样品时，样品的上层是很清楚的，深层则会模糊不清并且会产生相位移干扰及光的散射干扰。

(4) 盖玻片和载玻片的影响 样品一定要盖上盖玻片，否则环状光阑的亮环和相板的暗环很难重合。相差观察对载玻片和盖玻片的玻璃质量也有较高的要求，当有划痕，厚薄不均或凹凸不平时会产生亮环歪斜及相位干扰。另外玻片过厚或过薄时会使环状光阑亮环变大或变小。

### 三. 视频显微镜

将传统的显微镜与摄像系统，显示器或者电脑相结合，达到对被测物体的放大观察的目的。

最早的雏形应该是相机型显微镜，将显微镜下得到的图像通过小孔成像的原理，投影到感光照片上，从而得到图片。或者直接将照相机与显微镜对接，拍摄图片。随着 CCD 摄像机的兴起，显微镜可以通过其将实时图像转移到电视机或者监视器上，直接观察，同时也可以通过相机拍摄。80 年代中期，随着数码产业以及电脑业的发展，显微镜的功能也通过它们得到提升，使其向着更简便更容易操作的方面发展。到了 90 年代末，半导体行业的发展，晶圆要求显微镜可以带来更加配合的功能，硬件与软件的结合，智能化，人性化，使显微镜在工业上有了更大的发展。

### 四. 荧光显微镜

在荧光显微镜上，必须在标本的照明光中，选择出特定波长的激发光，以产生荧光，然后必须在激发光和荧光混合的光线中，单把荧光分离出来以供观察。因此，在选择特定波长中，滤光镜系统，成为极其重要的角色。

荧光显微镜原理：

(A) 光源：光源幅射出各种波长的光(以紫外至红外)。

(B) 激励滤光源：透过能使标本产生荧光的特定波长的光，同时阻挡对激发荧光无用的光。

(C) 荧光标本：一般用荧光色素染色。

(D) 阻挡滤光镜：阻挡掉没有被标本吸收的激发光有选择地透射荧光，在荧光中也有部分波长被选择透过。

## 五. 偏光显微镜

偏光显微镜是用于研究所谓透明与不透明各向异性材料的一种显微镜。凡具有双折射的物质，在偏光显微镜下就能分辨的清楚，当然这些物质也可用染色法来进行观察，但有些则不可能，而必须利用偏光显微镜。

### 主要特点

将普通光改变为偏振光进行镜检的方法，以鉴别某一物质是单折射（各向同性）或双折射性（各向异性）。双折射性是晶体的基本特性。因此，偏光显微镜被广泛地应用在矿物、化学等领域，在生物学和植物学也有应用。

### 基本原理

偏光显微镜的原理比较复杂，在此不作过多介绍，偏光显微镜必须具备以下附件：起偏镜，检偏镜，补偿器或相位片，专用无应力物镜，旋转载物台。

### 检术方式

#### 1、正相镜检（Orthoscope）

又称无畸变镜检，其特点是使用低倍物镜，不用伯特兰透镜（Bertrand Lens），被研究对象可直接用偏振光研究。同时为使照明孔径变小，推开聚光镜的上透镜。正相镜检用于检查物体的双折射性。

#### 2、锥光镜检（Conoscope）

又称干涉镜检，研究在偏振光干涉时产生的干涉图样，这种方法用于观察物体的单轴或双轴性。在该方法中，用强会聚偏振光束照明。

### 装置要求

#### 1、光源

最好采用单色光，因为光的速度，折射率，和干涉现象由于波长的不同而有差异。一般镜检可使用普通光。

#### 2、目镜

要带有十字线的目镜。

### 3、聚光镜

为了取得平行偏光，应使用能推出上透镜的摇出式聚光镜。

### 4、伯特兰透镜

聚光镜光路中的辅助部件，这是把物体所有造成的初级相放大为次级相的辅助透镜。它可保证用目镜来观察在物镜后焦平面中形成的干涉图样。

检术要求

- 1、载物台的中心与光轴同轴。
- 2、起偏镜和检偏镜应处于正交位置。
- 3、制片不宜过薄。

## 六. 超声波显微镜

超声波扫描显微镜的特点在于能够精确的反映出声波和微小样品的弹性介质之间的相互作用，并对从样品内部反馈回来的信号进行分析！图像上（C-Scan）的每一个象素对应着从样品内某一特定深度的一个二维空间坐标点上的信号反馈，具有良好聚焦功能的 Z. A 传感器同时能够发射和接收声波信号。一副完整的图像就是这样逐点逐行对样品扫描而成的。反射回来的超声波被附加了一个正的或负的振幅，这样就可以用信号传输的时间反映样品的深度。用户屏幕上的数字波形展示出接收到的反馈信息（A-Scan）。设置相应的门电路，用这种定量的时间差测量（反馈时间显示），就可以选择您所要观察的样品深度。

## 七. 解剖显微镜

解剖显微镜，又被称为实体显微镜或立体显微镜，是为了不同的工作需求所设计的显微镜。利用解剖显微镜观察时，进入两眼的光各来自一个独立的路径，这两个路径只夹一个小小的角度，因此在观察时，样品可以呈现立体的样貌，成像清晰和宽阔，又具有长工作距离。解剖显微镜的光路设计有两种：The Greenough Concept 和 The Telescope Concept。解剖显微镜常常用在一些固体样本的表面观察，或是解剖、钟表制作和小电路板检查等工作上。

它有如下特点：

1. 双目镜筒中的左右两光束不是平行，而是具有一定的夹角——体视角（一

一般为 12 度—15 度)，因此成像具有三维立体感；

2. 像是直立的，便于操作和解剖，这是由于在目镜下方的棱镜把像倒转过来的缘故；

3. 虽然放大率不如常规显微镜，但其工作距离很长

4. 焦深大，便于观察被检物体的全层。

5. 视场直径大。

目前立体镜的光学结构是：由一个共用的初级物镜，对物体成像后的两光束被两组中间物镜——变焦镜分开，并成一体视角再经各自的目镜成像，它的倍率变化是由改变中间镜组之间的距离而获得的，因此又称为“连续变倍体视显微镜”（Zoom—stereo microscope）。随着应用的要求，目前体视镜可选配丰富的选购附件，如荧光，照相，摄像，冷光源等等。