

第二讲 显微镜技术和显微镜（一）

习题作业

一、名词解释

1. 分辨率
2. 放大率
3. 数值孔径
4. 景深与焦长
5. 视野
6. 齐焦
7. 像差
8. 色差
9. 光学显微镜
10. 荧光显微镜
11. 相衬显微镜
12. 暗视野显微镜
13. 偏光显微镜
14. 激光扫描共聚焦显微镜
15. 倒置显微镜
16. 紫外光显微镜

二、简答题

1. 简述光学显微镜的结构组成和工作原理。
2. 光学显微镜的性能参数有哪些？这些参数间的影响和制约关系如何？
3. 物镜和目镜在工作条件和技术要求上有哪些不同？如何正确配合使用？
4. 简述医学检验中常用的荧光显微镜的原理、结构及用途。
5. 使用荧光显微镜时有哪些注意事项？
6. 简述偏光显微镜的结构与工作原理。
7. 简述激光扫描共聚焦显微镜的基本结构、工作原理及其在医学领域的主

要用途。

8. 简述相衬显微镜的结构特点和工作原理。

习题作业答案

一、名词解释

1. 分辨率：也称分辨本领，指分辨物体细微结构的的能力。

2. 放大率：或称放大倍数是指显微镜经多次成像后最终所成(放大的)像的大小相对于原物体大小的比值。

3. 数值孔径：又叫镜口率，是物体与物镜间媒质的折射率 n 与物镜孔径角的一半(β)正弦值的乘积。

4. 景深与焦长：在成一幅清晰像的前提下，像平面不变，景物沿光轴前后移动的距离称“景深”。景物不动，像平面沿光轴前后移动的距离称“焦长”。

5. 视野：视野又称视场，是指通过显微镜所能看到的标本所在空间的范围。

6. 齐焦：当某一物镜调焦清晰后，变换其它物镜时，也能基本保证焦距适当、成像清晰。

7. 像差：光学仪器不可能使物点发出而进入系统的所有光线都是沿着高斯光学的理想光路成像，从而导致成像在形状方面的缺陷，称之为像差。

8. 色差：是一种由白光或复色光在即使严格满足高斯条件下也存在的特殊类型的成像缺陷。当用白光或复色光经透镜成像时，会因各种色光存在着光程差而造成颜色不同、位置不重合、大小不一致的不同成像效果，从而造成像和物体的较大失真。

9. 光学显微镜：简称光镜，是利用日光照明将小物形成放大影像的精密光学仪器，由光学系统、机械装置和照明系统三部分组成。光学系统由物镜和目镜组成，其核心是物镜和目镜中的两组透镜，其放大成像的机理是先由物镜形成放大的实像，再由目镜进一步放大成虚像，最后在人眼中形成实像。

10. 荧光显微镜：荧光显微镜是以紫外线为光源来激发生物标本中的荧光物质，产生能观察到的各种颜色荧光的一种光学显微镜。

11. 相衬显微镜：是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，用于观察活细胞和未染色的标本的一种特殊显微镜。

12. 暗视野显微镜：是利用特殊的聚光镜使照明光线斜射而不能直接进入物镜，形成暗视野，那些经过标本散射的光线才能进入物镜放大，在黑暗的背景中呈现标本明亮的轮廓的显微镜。

13. 偏光显微镜：是利用光的偏振特性，对具有双折射性(即可以使一束入射光经折射后分成两束折射光)的晶态、液晶态物质进行观察和研究的重要光学仪器。

14. 激光扫描共聚焦显微镜：以单色激光作为光源的一种特殊光学显微镜。其物镜和聚光镜互相共焦点，使得只有从标本焦面发出的光线聚焦成像，而焦面以外的漫射光不参加成像，改变焦平面，可获得细胞或原标本不同层次的图像，从而得到样品的三维结构图像。

15. 倒置显微镜：当观测活体标本时，需要把照明系统放在载物台及标本之上，而把物镜组放在载物台器皿下进行放大成像的显微镜，又称生物培养显微镜。

16. 紫外光显微镜：使用紫外光源进行照明的显微镜。

二、简答题

1. 简述光学显微镜的结构组成和工作原理。

答：光学显微镜的基本结构包括光学系统和机械系统两大部分。光学系统是显微镜的主体部分，包括物镜、目镜、聚光镜及反光镜等组成的照明装置。机械系统是为了保证光学系统的成像而配置的，包括调焦系统、载物台和物镜转换器等运动夹持部件以及底座、镜臂、镜筒等支持部件。照明设置的主要部件有光源、滤光器、聚光镜和玻片等。

光学显微镜的工作原理由两组会聚透镜组成的光学折射成像系统，是利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，供人们提取物质微细结构信息的光学仪器。把焦距较短、靠近观察物、成实像的透镜组称为物镜，而焦距较长，靠近眼睛、成虚像的透镜组称为目镜。被观察物体位于物镜的前方，被物镜作第一级放大后成一倒立的实像，然后此实像再被目镜作第二级放大，得到最大放大效果的倒立的虚像，位于人眼的明视距离处。

2. 光学显微镜的性能参数有哪些？这些参数间的影响和制约关系如何？

答：光学显微镜的性能参数主要有放大率、数值孔径、分辨率、视场、景深、镜像亮度、

镜像清晰度、工作距离和机械筒长。显微镜的数值孔径与其放大率成正比，与分辨率、景深成反比，它的平方与图像亮度成正比。因此，使用较大数值孔径的物镜，其放大率和分辨本领较高，但视场、景深、工作距离较小。

3. 显微镜的物镜和目镜在工作条件和技术要求上有哪些不同？如何正确配合使用？

答：显微镜的物镜、目镜各由数只透镜组成一套，物镜和目镜间的不同组合构成不同的放大倍率。物镜采用转换器调换，显微镜的物镜应满足齐焦要求，即调换物镜后，不需要重新调焦就能看到物体的像。为此，不同倍率物镜的共轭距应为常数。目镜采用插入式调换，目镜的相对孔径很小，一般为 $1/20 \sim 1/40$ 。显微镜的目镜是在窄光束、大视场的条件下工作的。

4. 简述医学检验中常用的荧光显微镜的原理、结构、用途及使用注意事项。

答：医学检验中常用的荧光显微镜是以紫外线为光源来激发生物标本中的荧光物质，产生能观察到的各种颜色荧光的一种光学显微镜。

荧光显微镜是由光源、滤色系统和光学系统等主要部件组成。荧光显微镜与普通光学显微镜主要区别在于光源和滤光片不同。通常用高压汞灯作为光源，可发出紫外线和短波长的可见光；滤光片有二组，第一组称激发滤片，位于光源和标本之间，仅允许能激发标本产生荧光的光通过(如紫外线)；第二组是阻断滤片，位于标本与目镜之间，可把剩余的紫外线吸收掉，只让激发出的荧光通过，这样既有利于增强反差，又可保护眼睛免受紫外线的损伤。光学系统主要有反光镜、聚光镜、目镜、物镜、照明系统等组成。

荧光显微镜可用于观察检测细胞中能与荧光染料特异结合的特殊蛋白、核酸等，其标本染色简便、荧光图像色彩鲜亮，而且敏感度较高。

5. 使用荧光显微镜时有哪些注意事项？

答：使用荧光显微镜时应注意以下事项：①观察对象必须是可自发荧光或已被荧光染料染色的标本；②载玻片、盖玻片及镜油应不含自发荧光杂质；③选用最好的滤片组；④荧光标本一般不能长久保存，若持续长时照射(尤其是紫外线)易很快褪色。因此，如有条件则应先照相存档，再仔细观察标本；⑤启动高压汞灯后，不得在 15 分钟内将其关闭，一经关闭，必须待汞灯冷却后方可

再开启。严禁频繁开闭，否则，会大大降低汞灯的寿命；⑥若暂不观察标本时，可拉过阻光光帘阻挡光线。这样，即可避免对标本不必要的长时间照射，又减少了开闭汞灯的频率和次数；⑦较长时间观察荧光标本时，最好戴能阻挡紫外光的护目镜，加强对眼睛的保护。

6. 简述偏光显微镜的结构与工作原理。

答：偏光显微镜是利用光的偏振特性，对具有双折射性(即可以使一束入射光经折射后分成两束折射光)的晶态、液晶态物质进行观察和研究的重要光学仪器。

偏光显微镜是在一般显微镜的基础上增添了使普通光线转变成偏振光和检测偏振光的装置或观察干涉图样的特殊透镜，即光源前有偏振片（起偏器），使进入显微镜的光线为偏振光，镜筒中有检偏器（一个偏振方向与起偏器垂直的起偏器），这种显微镜的载物台是可以旋转的。当载物台无样品时，无论如何旋转载物台，由于两个偏振片是垂直的，显微镜里看不到光线。而放入旋光性物质后，由于光线通过这类物质时发生偏转，因此旋转载物台便能检测到这种物体。移相装置是偏光显微镜在使用过程中不可缺少的附件。全波片、半波片及 $1/4$ 波片可以使通过波片的偏振光分别延迟 2π 、 π 和 $\pi/2$ 的相位。而补偿器则可连续调节使通过的偏振光相位发生连续改变。移相装置对观察光的偏振性质是十分必要的。

7. 简述激光扫描共聚焦显微镜的基本结构、工作原理及其在医学领域的主要用途。

答：激光共聚焦显微镜是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置，利用计算机进行图像处理，使用紫外或可见光激发荧光探针，从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像。另外在其载物台上加一个微量步进马达，可使载物台沿着 Z 轴上下移动，将样品各个层面移到照明针孔和检测针孔的共焦面上，样品的不同层面的图像都能清楚地显示，成为连续的光切图像。

激光扫描共聚焦显微镜利用单色激光扫描束经过照明针孔形成点光源，对标本内焦平面上的每一点进行扫描，标本上的被照射点，在检测器的检测针孔处成像，由检测针孔后的光电倍增管逐点或逐线接收，迅速在计算机监视器屏

幕上形成荧光图像，照明针孔与检测针孔相对于物镜焦平面是共轭的。焦平面的点同时聚焦于照明针孔和检测针孔，焦平面以外的点不会在检测针孔处成像，这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面，克服了普通荧光显微镜图像模糊的缺点。另外在显微镜的载物台上加一个微量步进马达，可使载物台沿着 Z 轴上下移动，将样品各个层面移到照明针孔和检测针孔的共焦面上，样品的不同层面的图像都能清楚地显示，成为连续的光切图像。

8. 简述相衬显微镜的结构特点和工作原理。

答：相衬显微镜的结构特点：①环形光阑（annular diaphragm）位于光源与聚光镜之间，作用是使透过聚光镜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 $1/4\lambda$ ，并能吸收直射光(背景光)的光强，使直射光与衍射光的光强趋于一致，能更好地突出干涉的效果。

相衬显微镜的工作原理是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。