

# 显微镜的几种观察方式

来源：昆山华乃尔精密仪器有限公司 [www.huanair.com](http://www.huanair.com) 2011年3月8日

## 一. 明视野观察(Bright field BF)

明视野镜检是大家比较熟悉的一种镜检方式，广泛应用于病理、检验，用于观察被染色的切片，所有显微镜均能完成此功能。

明视野

## 二. 暗视野观察(Dark field DF)

暗视野实际是暗场照明。它的特点和明视野不同，不直接观察到照明的光线，而观察到的是被检物体反射或衍射的光线。因此，视场成为黑暗的背景，而被检物体则呈现明亮的象。

暗视野的原理是根据光学上的丁道尔现象，微尘在强光直射通过的情况下，人眼不能观察，这是因为强光绕射造成的。若把光线斜射它，由于光的反射，微粒似乎增大了体积，为人眼可见。

m.m 暗视野观察所需要的特殊附件是暗视野聚光镜。它的特点是不让光束由下至上的通过被检物体，而是将光线改变途径，使其斜射向被检物体，使照明光线不直接进入物镜，利用被检物体表面反射或衍射光形成的明亮图象。暗视野观察的分辨率远高于明视野观察，最高达0.02—0.004

暗视野

## 三. 相差镜检法(Phase contrast PH)

在光学显微镜的发展过程中，相差镜检术的发明成功，是近代显微镜技术中的重要成就。我们知道，人眼只能区分光波的波长(颜色)和振幅(亮度)，对于无色透明的生物标本，当光线通过时，波长和振幅变化不大，在明场观察时很难观察到标本。

相差显微镜利用被检物体的光程之差进行镜检，也就是有效地利用光的干涉现象，将人眼不可分辨的相位差变为可分辨的振幅差，即使是无色透明的物质也可成为清晰可见。这大大便利了活体细胞的观察，因此相差镜检法广泛应用于倒置显微镜。

相差图片

相差显微镜的基本原理是，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。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

相差原理

#### 四. 微分干涉称镜检术(Differential interference contrast DIC)

微分干涉镜检术出现于60年代，它不仅能观察无色透明的物体，而且图象呈现出浮雕状的立体感，并具有相衬镜检术所不能达到的某些优点，观察效果更为逼真。

原理：

微分干涉称镜检术是利用特制的渥拉斯顿棱镜来分解光束。分裂出来的光束的振动方向相互垂直且强度相等，光束分别在距离很近的两点上通过被检物体，在相位上略有差别。由于两光束的裂距极小，而不出现重影现象，使图象呈现出立体的三维感觉。

微分干涉图片

DIC 显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜，技术设计要复杂得多。DIC 利用的是偏振光，有四个特殊的光学组件：偏振器(polarizer)、DIC 棱镜、DIC 滑翔器和检偏器(analyzer)。偏振器直接装在聚光系统的前面，使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了诺玛斯棱镜，即 DIC 棱镜，此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光(x 和 y)，二者成一小夹角。聚光器将两束光调整成与显微镜光轴平行的方向。最初两束光相位一致，在穿过标本相邻的区域后，由于标本的厚度和折射率不同，引起了两束光发生了光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个诺玛斯棱镜，即 DIC 滑翔器，它把两束光波合并成一束。

这时两束光的偏振面(x 和 y)仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置，即检偏器。在光束形成目镜 DIC 影像之前，检偏器与偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光，从而使二者发生干涉。x 和 y 波的光程差决定着透光的多少。光程差值为0时，没有光穿过检偏器；光程差值等于波长一半时，穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上，标本结构呈现出亮暗差。为了使影像的反差达到最佳状态，可通过调节 DIC

滑翔器的纵行微调来改变光程差，光程差可改变影像的亮度。调节 DIC 滑翔器可使标本的细微结构呈现出正或负的投影形象，通常是一侧亮，而另一侧暗，这便造成了标本的人为三维立体感，类似大理石上的浮雕

微分干涉原理图

## 五. 偏光显微镜(Polarizing microscope POL )

偏光显微镜的特点

偏光显微镜是鉴定物质细微结构光学性质的一种显微镜。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发来进行观察，但有些则不可能，而必须利用偏光显微镜。

偏光显微镜的特点，就是将普通改变为偏光进行镜检的方法，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。

## 六. 浮雕相衬显微镜(RC HMC )

1975年，Robert Hoffman 博士发明

2002年，专利到期，各显微镜厂家纷纷推出采用以自己名义命名的 RC 技术产品

原理

斜射光照射到标本产生折射、衍射，光线通过物镜光密度梯度调节器产生不同阴影，从而使透明标本表面产生明暗差异，增加观察对比度

特点

提高未染色标本的可见性和对比度；

图象显示阴影或近似三维结构而不会产生光晕；

可检测双折射物质(岩石切片、水晶、骨头)；

可检测玻璃, 塑料等培养皿中的细胞, 器官和组织；

聚光镜的工作距离可以设计的更长；

RC 物镜也可用于明场, 暗场和荧光观察

## 七: 荧光显微镜(Fluorescence Microscopy FL)

荧光镜检术是用短波长的光线照射用荧光素染色过的被检物体，使之受激发后而产生长波长的荧光，然后观察。

荧光图象

优点：

? 检出能力高(放大作用)

? 对细胞的刺激小(可以活体染色)

? 能进行多重染色

用途:

? 物体构造的观察——荧光素

? 荧光的有无、色调比较进行物质判别——抗体荧光等

? 发荧光量的测定对物质定性、定量分析

荧光原理图

昆山华乃尔精密仪器有限公司

[www.huanair.com](http://www.huanair.com)

[www.huanair-opt.com](http://www.huanair-opt.com)