

第 1 章

普通光学显微镜的结构和基本原理

显微镜的种类很多，在实验室中常用的有普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等，电子显微镜简称电镜，包括透射电镜、扫描电镜、冷冻电镜等，但在微生物检验和研究中最常用的还是普通光学显微镜。

第 1 节 普通光学显微镜的结构和基本原理简介

普通光学显微镜由光学系统和机械系统两部分组成。光学系统一般包括目镜、物镜、聚光器、孔径光阑、光源等；机械系统一般包括镜筒、物镜转换器、载物台、镜臂和底座等（图 1.1）。



图 1.1 普通光学显微镜的结构

一、目镜

目镜的功能是把经物镜放大的物相再次放大，其上标有 $10\times$ 、 $16\times$ 等放大倍数记号。

目镜内的光阑称作视野光阑，标本会在光阑面上成像。目镜只起放大作用，不能提高分辨率。

二、物镜

物镜是显微镜中最重要的光学放大元件，直接影响显微镜的分辨能力。有低倍物镜（4×、10×、20×）、高倍物镜（40×、65×）和油镜（90×、100×）等不同的放大倍数物镜。物镜上标注有机械筒长、盖玻片厚度、放大倍数、数值孔径（numerical aperture, NA）及工作距离（物镜下端至盖玻片之间的距离，work distance, WD）等参数。其中，数值孔径是标本与物镜之间介质的折射率与1/2开口角（也称镜口角）正弦的乘积（式1.1）。

$$NA = n \cdot \sin\theta \quad \text{式 1.1}$$

其中， n 为介质折射率， $\theta = \alpha/2$ ， α 为最大开口角，即物镜前面的发光点进入物镜的角度。

当介质为空气时， $n=1$ ， θ 最大值为 90° （实际上不可能达到 90° ），所以此时物镜数值孔径均小于1。使用油镜时，介质为香柏油， $n=1.515$ ，与玻璃折射率（ $n=1.52$ ）相似，光线可以不发生折射而直接通过载玻片、香柏油进入物镜，使进入镜头的光线增加，可增加照明亮度和增大数值孔径。在目前技术条件下，NA 可达 1.4。

评价显微镜性能的优劣还有一个重要的指标是其分辨率的大小。分辨率是指显微镜工作时能够辨别出两个物点的最小距离的能力，分辨距离（ D ）越小，其分辨率就越高。分辨率是由所用光的波长和物镜数值孔径决定的（式1.2）。

$$D = 0.61 \times \lambda / NA \quad \text{式 1.2}$$

其中， λ 为所使用光的波长，NA 为物镜数值孔径。

提高显微镜的分辨率可以通过减小所使用光的波长或增大数值孔径来实现。普通光学显微镜所使用的光源只能在可见光的波长（400~770 nm）范围内，使用紫外光可以提高分辨率，但肉眼不能直接观察，应用范围仅限于显微拍摄。增大数值孔径是提高分辨率的理想措施。如前文所述，油镜可通过改变介质提高折射率从而增大数值孔径，使得分辨率显著提高。当用数值孔径为 1.25 的油镜来进行观察时，能分辨出距离不小于 $0.2 \mu\text{m}$ 的物点，而多数细菌的直径在 $0.5 \mu\text{m}$ 左右，故而可以通过油镜来观察细菌形态及其结构。

显微镜的总放大率是指物镜放大率和目镜放大率的乘积。

三、聚光器和孔径光阑

聚光器是汇聚光线的一组透镜，其作用是把平行的光线聚焦于标本上，增加照明度。一般使用低倍镜时，下降聚光器，使用油镜时，将它升至最高位置。聚光器的下方安装有可变光阑（光圈），调节孔径光阑可以调节数值孔径的大小，改变光强度，使之与物镜相匹配，获得分辨率与对比度均适合的观察视野。在观察较透明标本时，光圈宜适当缩小些，虽降低了分辨率，但增强了对比度，从而使较透明的标本看得更为清晰。

第 2 节 普通显微镜的使用方法

一、使用前准备

(1) 放置显微镜：使用显微镜时需轻拿轻放，一手握镜臂一手托底座或双手握镜臂，将它抬离桌面，轻轻放置在适合观察的位置，期间保持机身水平。

(2) 开机及调节光亮度：打开电源开关（将开关拨至“1”侧），旋转亮度调节钮，调至适合的视野亮度。

(3) 调节聚光器：拨动聚光器手柄使其达到最高位置，然后慢慢降低聚光器位置直至视野背景中光度均匀，漫散射图像消失（图 1.2）。

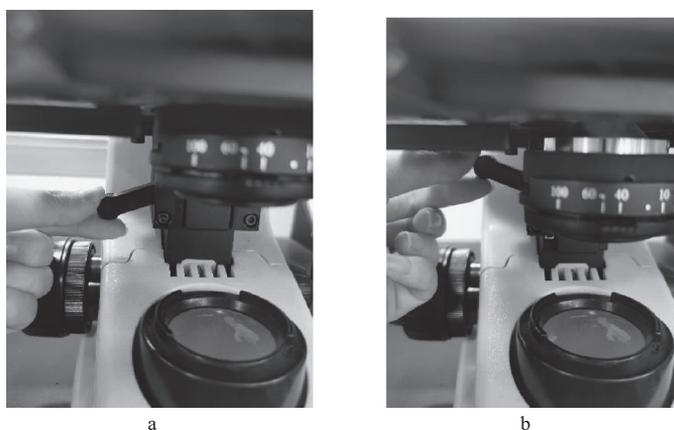


图 1.2 聚光器调节

a 聚光器高位；b 聚光器低位

(4) 安放标本：将玻片标本正置于载物台上，拨开标本夹使得玻片标本右上角顶住标本夹右上角，松开标本夹使其固定住标本。玻片标本需完全水平放置在载物台上。调节载物台横向及纵向移动手轮，使标本正对光路。

二、低倍镜观察

低倍镜视野范围大，工作距离长，容易发现观察目标，确定观察部位。因此，显微观察从低倍镜开始。

(1) 调节物镜：旋转物镜转换器，当物镜准确移入光路时会听到定格声。由于微生物个体较小，通常用 $10\times$ 物镜开始观察微生物。

(2) 调节孔径光阑：拨动孔径光阑调节杆，使之位于与物镜放大倍数相匹配的位置，此时可以在镜下观察到有足够对比度的高质量物像（如果孔径光阑的标注为数字，则根据物镜上标注的数值孔径 $\times 0.7$ 的值，调节孔径光阑至适合的开度）（图 1.3）。

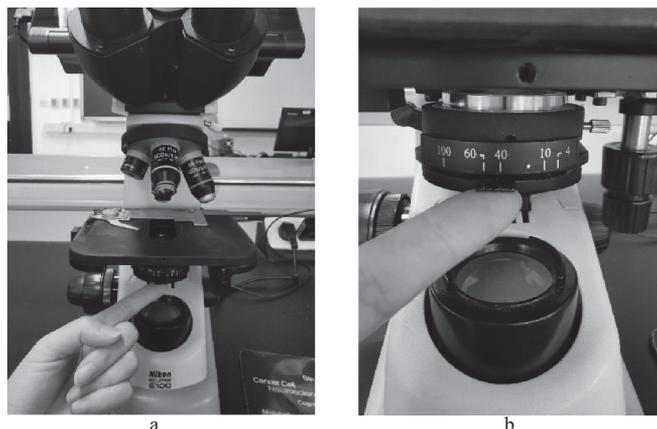


图 1.3 孔径光阑调节（以 40×物镜为例）

a 孔径光阑调节杆位置；b 不同放大倍数的物镜对应的孔径光阑位置示意

(3) 调节焦距：转动粗调焦手轮，将载物台调至最高处。透过目镜观察视野，调节粗调焦手轮，使载物台缓慢下降，调节载物台移动手轮，寻找玻片标本的物像。找到物像后调节微调焦手轮，直到观察到清晰物像为止。如有必要，重复以上步骤。

(4) 调节瞳距：观察标本时，通过上下搬动两个目镜的镜筒来调节两目镜间距，使左、右目镜中的图像合二为一。此时目镜的间距是适合实验者瞳距的。

三、高倍镜观察

高倍镜视野范围比低倍镜的小，工作距离短，使用高倍镜观察前，应先用低倍镜对焦，观察到清晰玻片标本物像后，切勿下降低物台。

(1) 调节物镜：用低倍物镜找到标本并调节清晰后，将欲放大的观察部位调至视野中央。旋转物镜转换器，将高倍镜置于光路。

(2) 调节焦距：慢慢旋转微调焦手轮调节焦距，直到物像清晰为止。此时可用限位手轮固定此位置。

(3) 调节孔径光阑：从低倍镜换到高倍镜观察时，由于高倍镜数值孔径变大，需拨动孔径光阑调节杆使之与物镜匹配。同时，可调节亮度调节钮增大光亮度。

(4) 调节聚光器：若用 40×物镜进行细胞计数时，为同时看清楚细胞与计数室刻度，适当下调聚光器位置亦可弥补景深不足，达到最佳观察效果。

(5) 调节视度：如观察者双眼具有视力差，用高倍镜观察时会出现双眼成像不在同一焦平面、物像模糊的情况，此时可用屈光度调节环调节视度。先旋转屈光度调节环，使其下端与刻线（沟槽）对齐，此时是零视度位置；用一侧眼观察同侧目镜中的物像，使之在 40×物镜准确聚焦至物像清晰；再以另一侧眼观察其同侧目镜，旋转屈光度调节环，直至该侧目镜观察物像清晰、双目同焦为止（图 1.4）。如有必要，可重复上述步骤。



图 1.4 视度调节

a. 零视度；b. 旋转屈光度调节环调节视度

四、油镜观察

油镜的工作介质是香柏油，工作距离很小 [某显微镜 $100\times$ 油镜的工作距离 (WD) 为 0.14 mm]，使用时要防止载玻片和物镜上的透镜损坏。使用时，物镜的顺序一般是低倍镜、高倍镜再到油镜。

(1) 物镜调节：从低倍镜至高倍镜观察玻片标本并聚焦后，将欲放大进一步观察的部位调至视野中心；旋转物镜转换器将高倍镜移出光路，从侧面在盖玻片上滴加一滴镜油；再转动物镜转换器，使油镜对准光路。

(2) 调节孔径光阑：拨动孔径光阑调节杆使之与物镜匹配。同时，可调节亮度调节钮增大光亮度。

(3) 调节聚光器：拨动聚光器调节杆，将聚光器调至最高位置。

(4) 调节焦距：一边从目镜观察，一边慢慢旋转微调焦手轮调节焦距，直到物像清晰为止。如观察不到清晰的物像，有可能是在调焦时过快地旋转调焦手轮，因油镜成像景深小而使得眼睛无法捕捉一闪而过的物像。

五、清洁与复位

(1) 清洁油镜：先用擦镜纸擦去油镜上的香柏油，再用滴加了擦镜液（乙醚：乙醇 = 7：3，亦可根据空气干燥程度调整为 6：4）的擦镜纸擦油镜 2~3 次，最后再次用干净的擦镜纸擦拭油镜，直至擦镜纸上没有油污。使用擦镜纸擦拭镜头时应打圈擦拭或顺同一方向擦拭。

(2) 清洁其他镜头：如果需要，用擦镜纸及擦镜液清洁其他物镜和目镜。

(3) 复位：低倍镜正对光路（或物镜转成“八”字式），载物台降至最低，取下玻片标本，目镜间距调至最小，屈光度调节环调至零视度，聚光器升至最高，孔径光阑调至最小，

光源亮度调至最低，关闭光源，罩上防尘罩。

第3节 普通显微镜的保养

显微镜是精密贵重的光学仪器，正确使用、维护和保养，可保证其良好性能，同时延长其使用寿命。

(1) 显微镜应存放于通风干燥、少灰尘、不暴晒的地方。避免与酸、碱或其他易挥发具有腐蚀性的化学物品、仪器一起存放。不使用时罩上防尘罩或放入显微镜柜。

(2) 小心搬运，取出时需一手提镜臂，一手托镜座，严禁单手提镜，勿使镜体倾斜，防止目镜从镜筒中滑出或碰撞显微镜。

(3) 调节粗调焦手轮将载物台向上调节时，须从侧面观察，以防损坏物镜。观察标本时，须按照低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序进行，以防调焦不当损坏物镜。

(4) 一般情况下观察标本均要加盖盖玻片，切忌水、酒精或其他药品浸损镜头或载物台。

(5) 取换玻片标本时，应在低倍镜下进行，不可在高倍镜或油镜下取换玻片标本。转换物镜镜头时，应转动物镜转换器，切忌直接扳动镜头。

(6) 显微镜各部件要保持清洁，**光学部件必须用擦镜纸擦拭**，绝对禁止用其他物品擦拭。使用油镜后，应严格按照油镜清洁方法擦拭油镜，切勿将香柏油残留在油镜上。显微镜的金属油漆部件和塑料部件，可用软布蘸中性洗涤剂进行擦拭，不可使用有机溶剂。

(7) 使用显微镜时一定要严格按规程操作，遇到问题，如机件不灵，千万不可用力转动，切忌任意拆修，应立即报告指导教师。

参考文献

- [1] 陈金春,陈国强.微生物学实验指导[M].2版.北京:清华大学出版社,2007.
- [2] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].2版.北京:北京大学出版社,2008.
- [3] 徐德强,王英明,周德庆.微生物学实验教程[M].4版.北京:高等教育出版社,2019.
- [4] 李玉明,王洪钟,李鹏.大学生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2022.