

高级光学显微镜原理

吴旭

2010-10-14

- 显微镜发展历史
- 显微镜的基本光学原理
- 显微镜的重要光学技术参数
- 显微镜的光学附件
- 常用显微镜技术
- 光学显微镜技术的发展

一. 历史

- 1590 据说荷兰 詹森父子制造出第一台原始的， $20\times$ 的显微镜；
- 1610 意大利 伽利略制造了复式显微镜；
- 1611 开普勒 阐明了显微镜的基本原理；
- 1665 英国物理学家罗伯特.胡克， $140\times$ ；
- 不久，荷兰 安东尼.范.列文虎克， $270\times$ ；
- 1684 荷兰 惠更斯目镜；
- 1870 德国物理学家，光学大师恩斯特.阿贝提出了显微镜的完善理论；

胡克的显微镜和他看到的细胞



Figure 1.19 (a) The microscope used by Robert Hooke. (b,c) Two drawings by Robert Hooke which represent one of the first microscopic descriptions of microorganisms. (b) A blue mold growing on the surface of leather; the round structures contain spores of the mold. (c) A mold growing on the surface of an aging, deteriorating rose leaf.

- 1902 德国 艾夫斯 现代双目显微镜的基本系统；
- 1941 Zeiss相差显微镜；
- 20世纪60年代中期 Nomarski微分干涉相差显微镜；
- 近年来：共聚焦显微镜（LSCM），全反射显微镜（TIRF），受激发射损耗（STED）显微镜等。



19世纪中期的显微镜

20世纪初期的显微镜



带自动照相机的光学显微镜



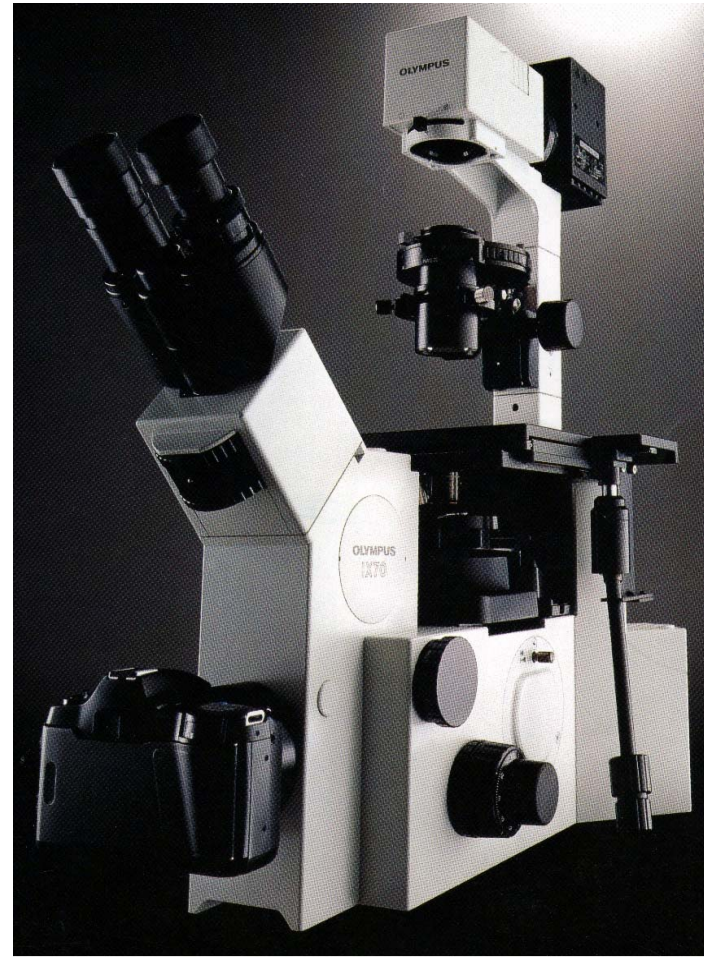
超高压透射电子显微镜



装有场发射枪的扫描电子显微镜

实验中心现有的显微镜

正、倒置显微镜





细胞遗传工作站

用于:

对荧光标记的生物样品（染色体）进行观察和分析

激光共聚焦扫描显微镜



激光显微切割系统



活细胞影像系统



二．显微镜的基本光学原理

- 折射和折射率

折射率 $n=c/v$

- 透镜的性能

形状：双凸或双凹透镜

凹凸或凸凹透镜

平凸或平凹透镜

复杂程度：

单透镜、复透镜、透镜组

- 影响成像的关键因素-相差

- 色差 (Chromatic aberration)

- 球差(Spherical aberration)

- 慧差(Coma)

- 象散 (Astigmatism)

- 场曲 (Curvature of field)

- 畸变 (Distortion)

采用设计合理的镜头、选择各片透镜的几何尺寸和折射率

• 显微镜的成像（几何成像）原理

凸透镜的5种成像规律：

- （1）当物体位于透镜物方二倍焦距以外时，则在象方二倍焦距以内、焦点以外形成缩小的倒立实象；
- （2）当物体位于透镜物方二倍焦距上时，则在象方二倍焦距上形成同样大小的倒立实象；
- （3）当物体位于透镜物方二倍焦距以内，焦点以外时，则在象方二倍焦距以外形成放大的倒立实象；
- （4）当物体位于透镜物方焦点上时，则象方不能成像；
- （5）当物体位于透镜物方焦点以内时，则象方也无象的形成，而在透镜物方的同侧比物体远的位置形成放大的直立虚象。

物体处在物镜前 $F-2F$ （ F 为物方焦距）之间，则在物镜象方的二倍焦距以外形成放大的倒立实象。在显微镜的设计上，将此象落在目镜的一倍焦距 F_1 之内，使物镜所放大的第一次象（中间象），又被目镜再一次放大，最终在目镜的物方（中间象的同侧）、人眼的明视距离（ 250mm ）处形成放大的直立（相对中间象而言）虚象

- 万能无限远 (UIS)校正光学系统

- 光线通过物镜后成为平行光束通过镜筒，并在结象透镜处折射或完成无相差的中间象。
- 物镜与观察筒内结象透镜之间可添加光学附件，而不影响总放大倍数
- 不需要安装附加校正透镜

三．显微镜的重要光学技术参数

- 数值孔径
- 分辨率
- 放大倍数
- 焦深
- 视场直径（Field of view）
- 覆盖差
- 工作距离

四．显微镜的光学附件

- 物镜
 - 合轴、齐焦
- 目镜
- 聚光镜
- 照明装置
- 光轴

● 物镜

1. 消色差物镜 (Achromatic objective) : 这是常见的物镜, 外壳上常有"Ach"字样。这类物镜仅能校正轴上点的位置色差(红, 蓝二色)和球差(黄绿光)以及消除近轴点慧差。不能校正其它色光的色差和球差, 且场曲很大。

2. 复消色差物镜 (Apochromatic objective) : 复消色差物镜的结构复杂, 透镜采用了特种玻璃或萤石等材料制作而成, 物镜的外壳上标有"Apo"字样, 这种物镜不仅能校正红绿蓝三色光的色差, 同时能校正红, 蓝二色光的球差。由于对各种相差的校正极为完善, 比响应倍率的消色差物镜有更大的数值孔径, 这样不仅分辨率高, 象质量优而且也有更高的有效放大率。因此, 复消色差物镜的性能很高, 适用于高级研究镜检和显微照相。

3. 半复消色差物镜 (Semi apochromatic objective) : 半复消色差物镜又称氟石物镜, 物镜, 物镜的外壳上标有"FL"字样, 在结构上透镜的数目比消色差物镜多, 比负消色差物镜少, 成象质量上, 远较消色差物镜为好, 接近于复消色差物镜。平场物镜是在物镜的透镜系统中增加一快半月形的厚透镜, 以达到校正场曲的缺陷。平场物镜的视场平坦, 更适用于镜检和显微照相。

4. 特种物镜: 所谓"特种物镜"是在上述物镜的基础上, 专门为达到某些特定的观察效果而设计制造的。主要有以下几种:

(1) 带校正环物镜 (Correction collar objective) :

在物镜的中部装有环装的调节环, 当转动调节环时, 可调节物镜内透镜组之间的距离, 从而校正由盖玻片厚度不标准引起的覆盖差。调节环上的刻度可从0.11--0.23, 在物镜的外壳上也标有此数字, 表明可校正盖玻片从0.11-0.23mm厚度之间的误差。

(2) 带虹彩光阑的物镜 (Iris diaphragm objective) :

在物镜镜筒内的上部装有虹彩光阑, 外方也可以旋转的调节环, 转动时可调节光阑孔径的大小, 这种结构的物镜是高级的油浸物镜, 它的作用是在暗视场镜检时, 往往由于某些原因而使照明光线进入物镜, 使视场背景不够黑暗, 造成镜检质量的下降。这时调节光阑的大小, 使背景变黑, 使被检物体更明亮, 增强镜检效果。

(3) 相衬物镜 (Phase contrast objective) :

这种物镜是由于相衬镜检术的专用物镜, 其特点是在物镜的后焦平面处装有相板。

(4) 无罩物镜 (No cover objective) : 有些被检物体, 如涂抹制片等, 上面不能加用盖玻片, 这样在镜检时应使用无罩物镜, 否则图象质量将明显下降, 特别是在高倍镜检时更为明显。这种物镜的外壳上常标刻NC, 同时在盖玻片厚度的位置上没有0.17的字样, 而标刻着"0"。

(5) 长工作距离物镜: 这种物镜是倒置显微镜的专用物镜, 它是为了满足组织培养, 悬浮液等材料的镜检而设计。

- 目镜
- 聚光镜

1. 阿贝聚光镜 (Abbe condenser)

这是由德国光学大学大师恩斯特·阿贝(Ernst Abbe)设计。阿贝聚光镜由两片透镜组成，有较好的聚光能力，但是在物镜数值孔径高于0.60时，则色差，球差就显示出来。因此，多用于普通显微镜上。

2. 消色差聚光镜(Achromatic aplanatic condenser)

这种聚光镜又名"消色差消球差聚光镜"和"齐明聚光镜"它由一系列透镜组成，它对色差球差的校正程度很高，能得到理想的图象，是明场镜检中质量最高的一种聚光镜，其NA值达1.4。因此，在高级研究显微镜常配有此种聚光镜。它不适用于4 X以下的低倍物镜，否则照明光源不能充满整个视场。

3. 摇出式聚光镜 (Swing out condenser)

在使用低倍物镜时（如4X），由于视场大，光源所形成的光锥不能充满真整个视场，造成视场边缘部分黑暗，只中央部分被照亮。要使视场充满照明，就需将聚光镜的上透镜从光路中摇出。

4. 其它聚光镜：

聚光镜除上述明场使用的类型外，还有作特殊用途的聚光镜。如暗视野聚光镜，相衬聚光镜，偏光聚光镜，微分干涉聚光镜等，以上聚光镜分别适用于相应的观察方式。

- 显微镜的照明装置
- 1. 透射式照明
 - 中心照明
 - 临界照明
 - 柯勒照明
 - 斜射照明
- 2. 落射式照明

- **A. 临界照明 (Critical illumination)** :这是普通的照明法。这种照明的特点是光源经聚光镜后成象在被检物体上,光束狭而强,这是它的优点。但是光源的灯丝象与被检物体的平面重合,这样就造成被检物体的照明呈现出不均匀性,在有灯丝的部分则明亮;无灯丝的部分则暗淡,不仅影响成象的质量,更不适合显微照相,这是临界照明的主要缺陷。其补救的方法是在光源的前方放置乳白和吸热滤色片,使照明变得较为均匀和避免光源的长时间的照射而损伤被检物体。
- **B. 柯勒照明:**柯勒照明克服了临界照明的缺点,是研究用显微镜中的理想照明法。这种照明法不仅观察效果佳,而且是成功地进行显微照相所必须的一种照明法。光源的灯丝经聚光镜及可变视场光阑后,灯丝象第一次落在聚光镜孔径的平面处,聚光镜又将该处的后焦点平面处形成第二次的灯丝象。这样在被检物体的平面处没有灯丝象的形成,不影响观察。此外照明变得均匀。观察时,可改变聚光镜孔径光阑的大小,使光源充满不同物镜的入射光瞳,而使聚光镜的数值孔径与物镜的数值孔径匹配。同时聚光镜又将视场光阑成象在被检物体的平面处,改变视场光阑的大小可控制照明范围。此外,这种照明的热焦点不在被检物体的平面处,即使长时间的照明,也不致损伤被检物体。

- 显微镜的光轴调节
在显微镜的光学系统中，光源、聚光镜、物镜和目镜的光轴以及光阑的中心必须与显微镜的光轴同在一直线上，所以在镜检前必须进行显微镜光轴的调节，否则不能达到最佳观察效果。
 1. 光源灯丝调节：旧式显微镜需要调节灯泡的位置。目前的新型显微镜的光源已经进行了预定心设置，所以不需要调整。
 2. 聚光镜的中心调整：实际上显微镜光轴的调整的重点即是聚光镜的位置调整。
首先将视场光阑缩小，用10X物镜观察，在视场内可见到视场光阑的轮廓，如果不在中央，则利用聚光镜外侧的两个调整螺钉将其调至中央部分，当缓慢地增大视场光阑时，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓象完全与视场边缘内接，说明已经和轴。和轴后再略为增大视场光阑，使轮廓象刚好处于视场外切或略大。
 3. 孔径光阑的调节：孔径光阑安装在聚光镜内，研究用显微镜的聚光镜的外侧边缘上都有科数及定位记号，这样便于调节聚光镜与物镜的数值孔径相匹配，原则上说更换物镜时需调整聚光镜的数值孔径，一般物镜的数值孔径乘0.6或0.8就是聚光镜的数值孔径。

五. 常用显微镜技术

- 一. 明视野观察 (Bright field)
- 二. 暗视野观察 (Dark field)
- 三. 相衬镜检法 (Phase contrast)

相衬镜检法在装置上与明场不同, 有一些特殊要求:

1. 环状光阑 (Ring slit): 装在聚光镜的下方, 而与聚光镜组合为一体---相衬聚光镜。它是由大小不同的环形光阑装在一圆盘内, 外面标有10X、20X、40X、100X等字样, 与相对应倍数的物镜配合使用。

2. 相板 (Phase plate): 装在物镜的后焦平面处, 它分为两部分, 一是通过直射光的部分, 为半透明的环状, 叫共轭面; 另一是通过衍射光的部分, 叫"补偿面"。有相板的物镜称"相衬物镜", 外壳上常有"Ph"字样。

相衬镜检法是一种比较复杂的镜检方法, 想要得到好的观察效果, 显微镜的调试非常重要。除此之外还应注意以下几个方面。

1. 光源要强, 全部开启孔径光阑;
2. 使用滤色片, 使光波近于单色;

- 四. 微分干涉 (Differential interference contrast DIC)

微分干涉技术出现于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壮的立体感, 并具有相衬所不能达到的某些优点, 观察效果更为逼真。

1. 原理

微分干涉是利用特制的棱镜来分解光束。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。

2. 微分干涉所需的特殊部件:

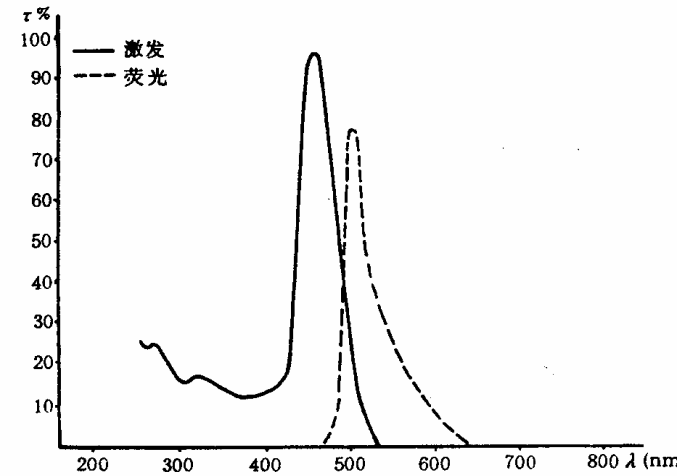
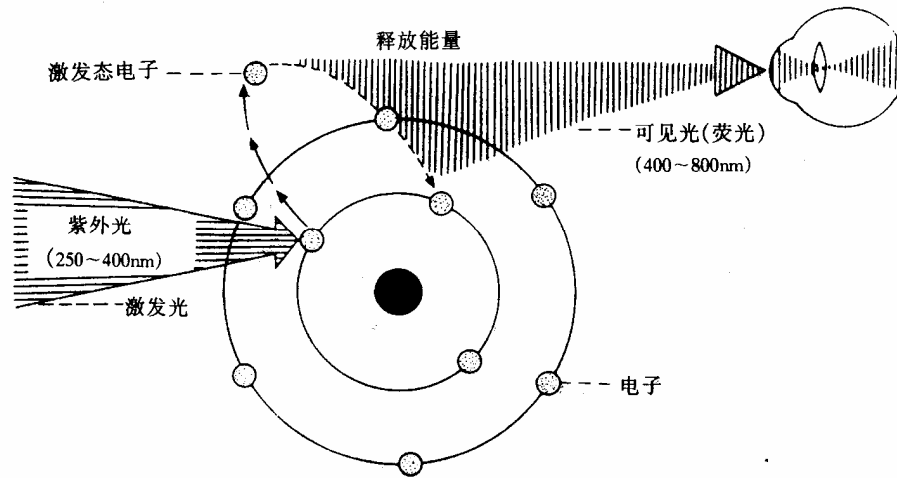
- (1) 起偏镜
- (2) 检偏镜
- (3) 渥拉斯顿棱镜2 块

3. 微分干涉镜检时的注意事项

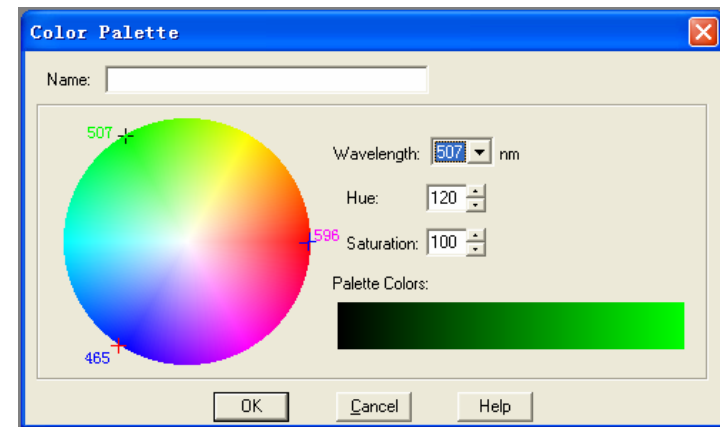
- (1) 因微分干涉灵敏度高, 制片表面不能有污物和灰尘。
- (2) 具有双折射性的物质, 不能达到微分干涉镜检的效果。
- (3) 倒置显微镜应用微分干涉时, 不能用塑料培养皿。

- 五.荧光显微镜技术

荧光原理



- 荧光：短波长的光线照射某物质时，这种物质在极短时间内，能发射出波长较激发光长的可见光，这种光就称为“荧光”。
- 如：FITC，激发光488nm，发射光515nm；
异硫氰酸荧光素，激发光490nm，发射光525nm。

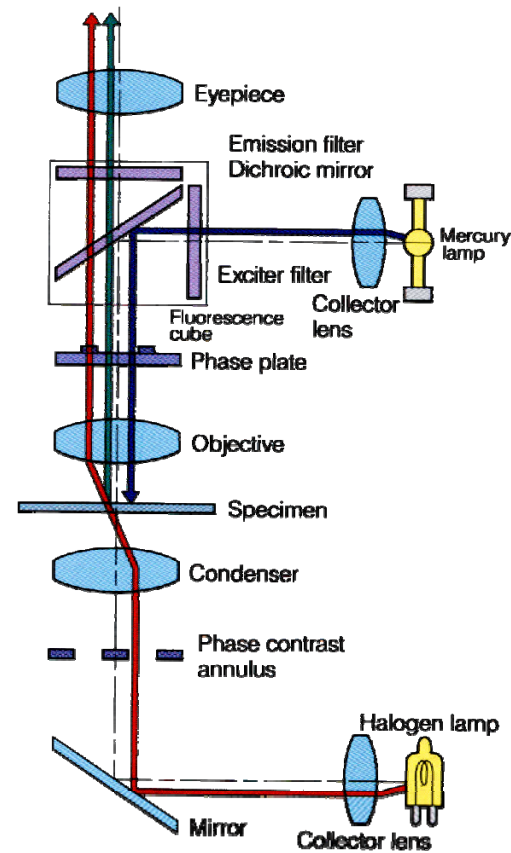


荧光显微镜的光源和光路

- 明场：透射
- 荧光：落射

落射的优点：

- 物镜的聚光镜作用使视场均匀，发射光强度高。
- 激发光损失小，荧光效应高。



- 注意事项

(1) 激发光长时间的照射，会发生荧光的衰减和淬灭现象，因此尽可能缩短观察时间，暂时不观察时，应用挡板遮盖激发光。

(2) 作油镜观察时，应用"无荧光油"。

(3) 荧光几乎都较弱，应在较暗的室内进行。

(4) 电源最好装稳压器，否则电压不稳不仅会降低汞灯的寿命，也会影响镜检的效果。

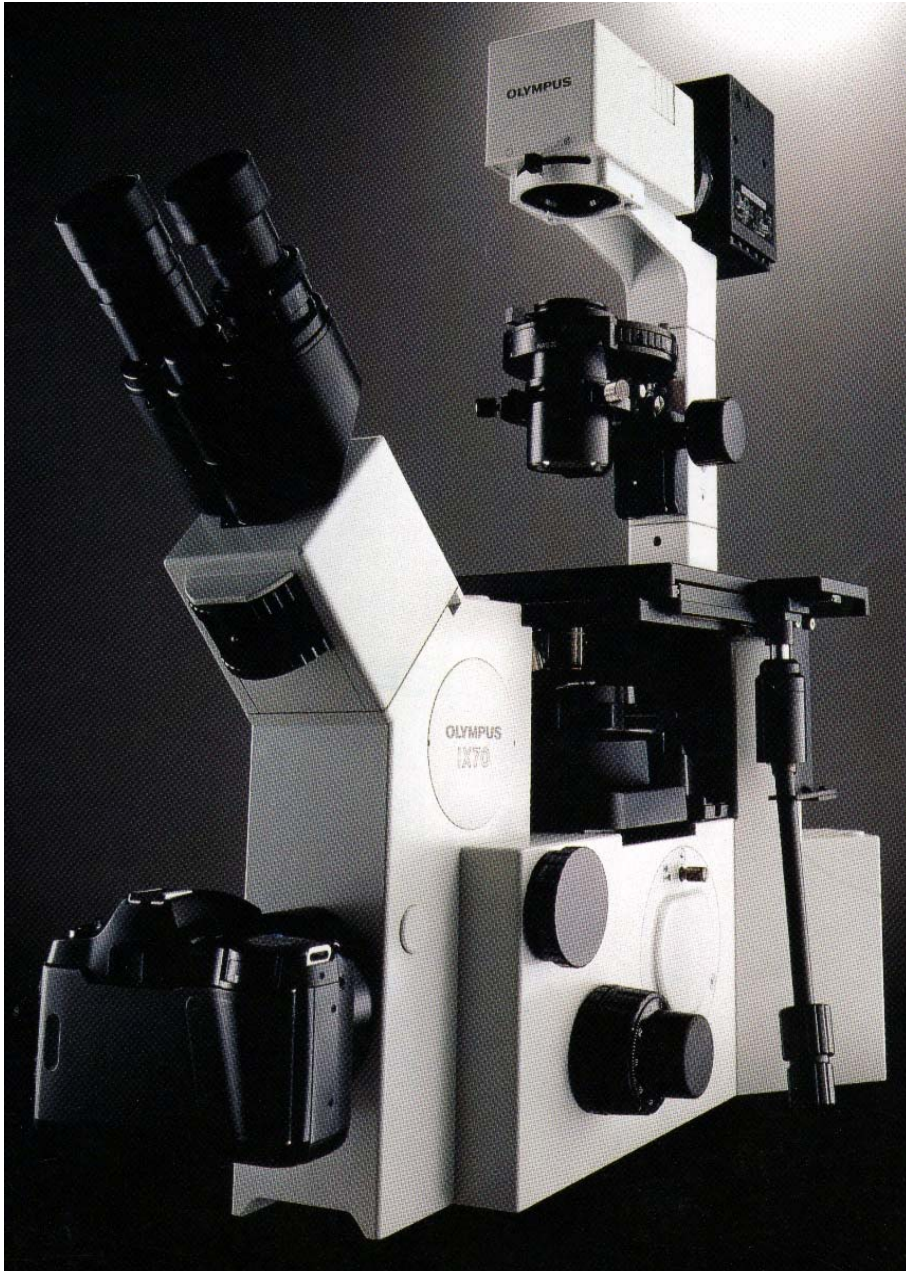
显微镜的类型

- 正置
- 倒置
- 体视



正置显微镜

- 标准盖玻片厚度
0.17mm，载玻片厚度
1.1mm
- 载物台与物镜间的工作距离有限
- 清晰度高
- 物镜最大放大倍数
150X
- 主要用于切片的观察



倒置显微镜

- 物镜、聚光镜、光源的位置颠倒
- 长工作距离物镜和聚光镜
- 透射光源和载物台之间空间更宽敞
- 清晰度略低于正置
- 物镜最大放大率60X;
- 多用于无色透明的活体观察，如组织培养、细胞离体培养、浮游生物、环境保护、食品检验

- 体视显微镜又称"实体显微镜"或"解剖镜", 是一种具有正象立体感地目视仪器, 被广泛地应用于生物学、医学、农林、工业及海洋生物各部门。它具有如下地特点:

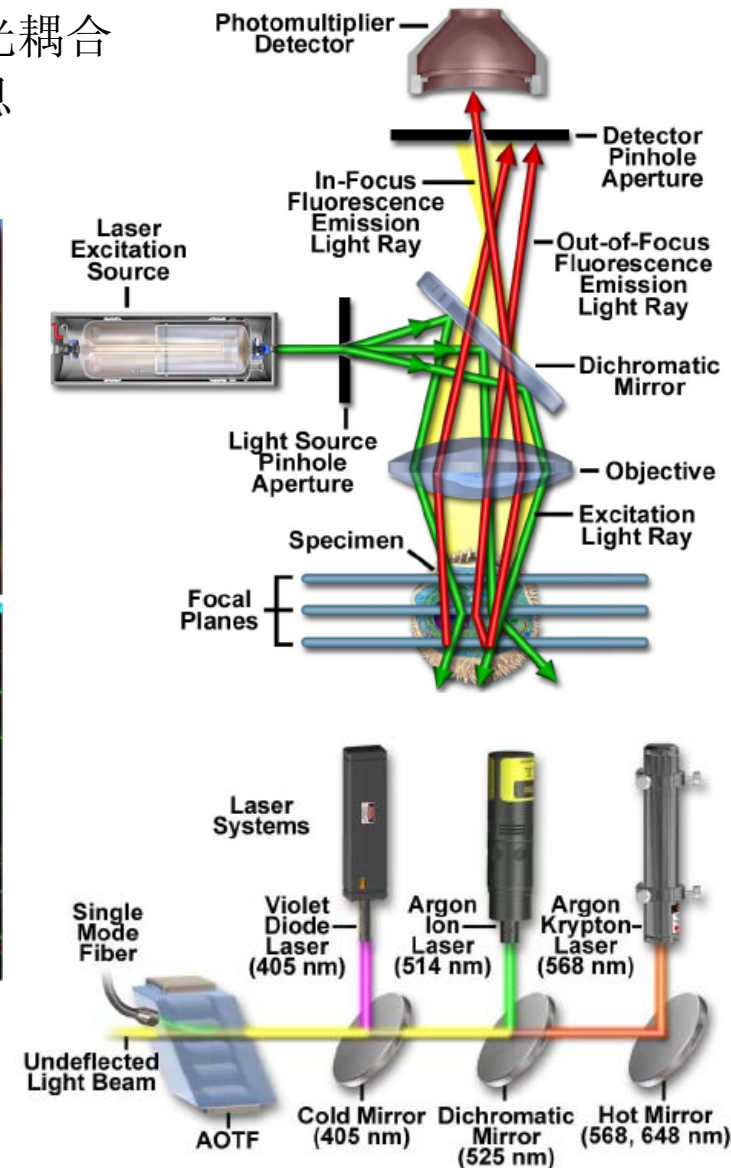
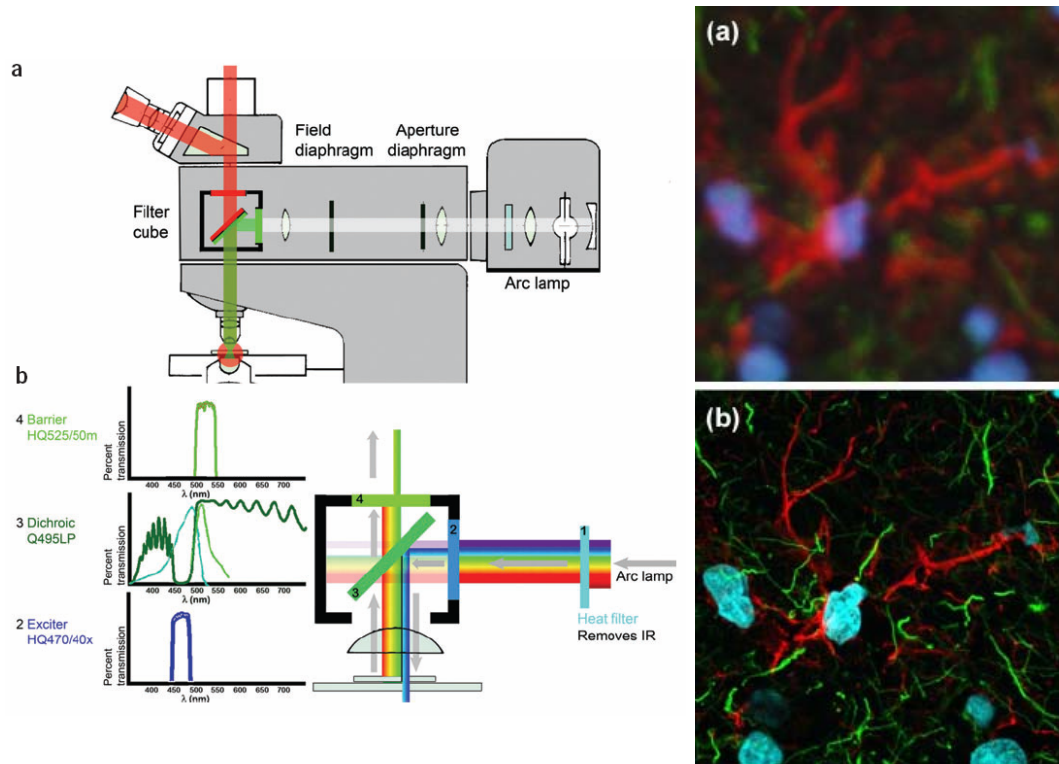
1. 双目镜筒中的左右两光束不是平行, 而是具有一定的夹角---体视角(一般为12度---15度), 因此成象具有三维立体感;
2. 象是直立的, 便于操作和解剖, 这是由于在目镜下方的棱镜把象倒转过来的缘故;
3. 虽然放大率不如常规显微镜, 但其工作距离很长
4. 焦深大, 便于观察被检物体的全层。
5. 视场直径大。

目前体视镜的光学结构是: 由一个共用的初级物镜, 对物体成象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象, 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)。

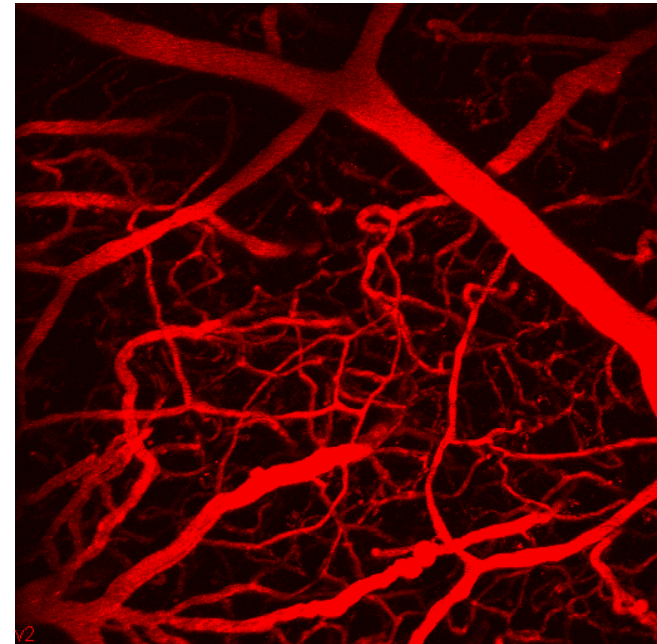
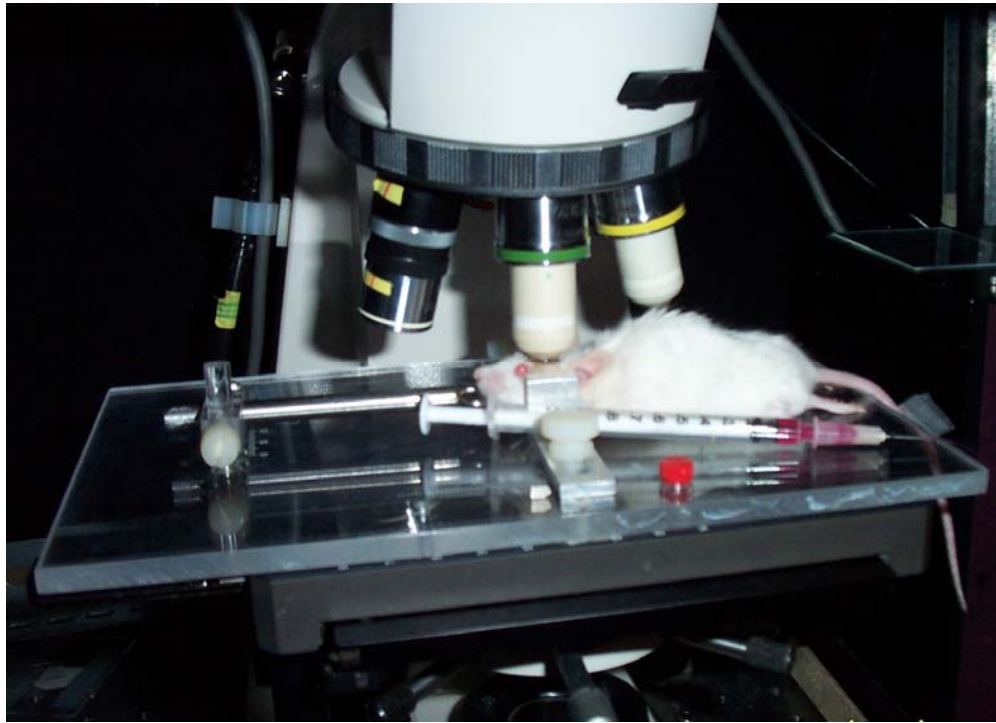
随着应用的要求, 目前体视镜可选配丰富的选购附件, 如荧光, 照相, 摄象, 冷光源等等。

六. 光学显微镜技术的发展

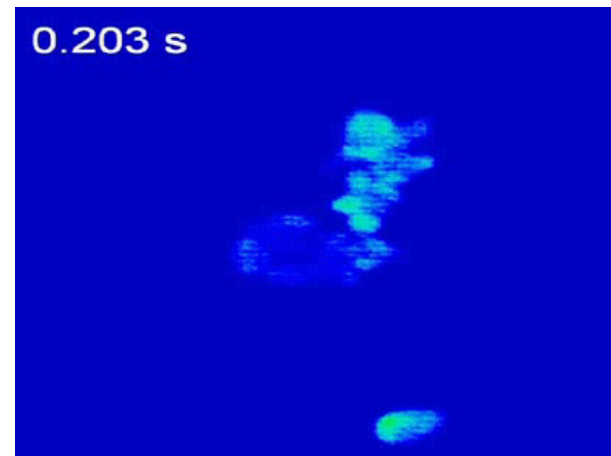
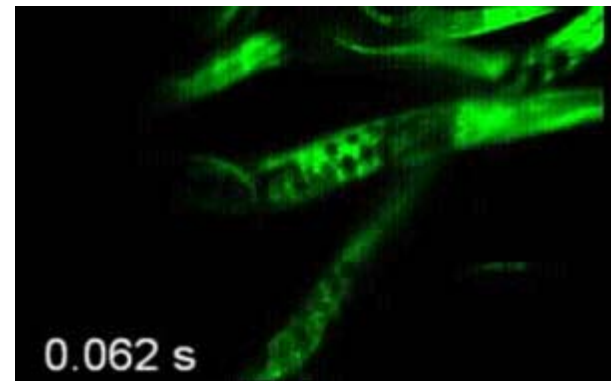
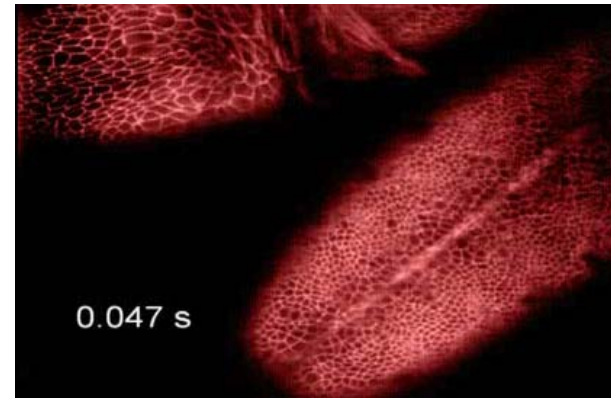
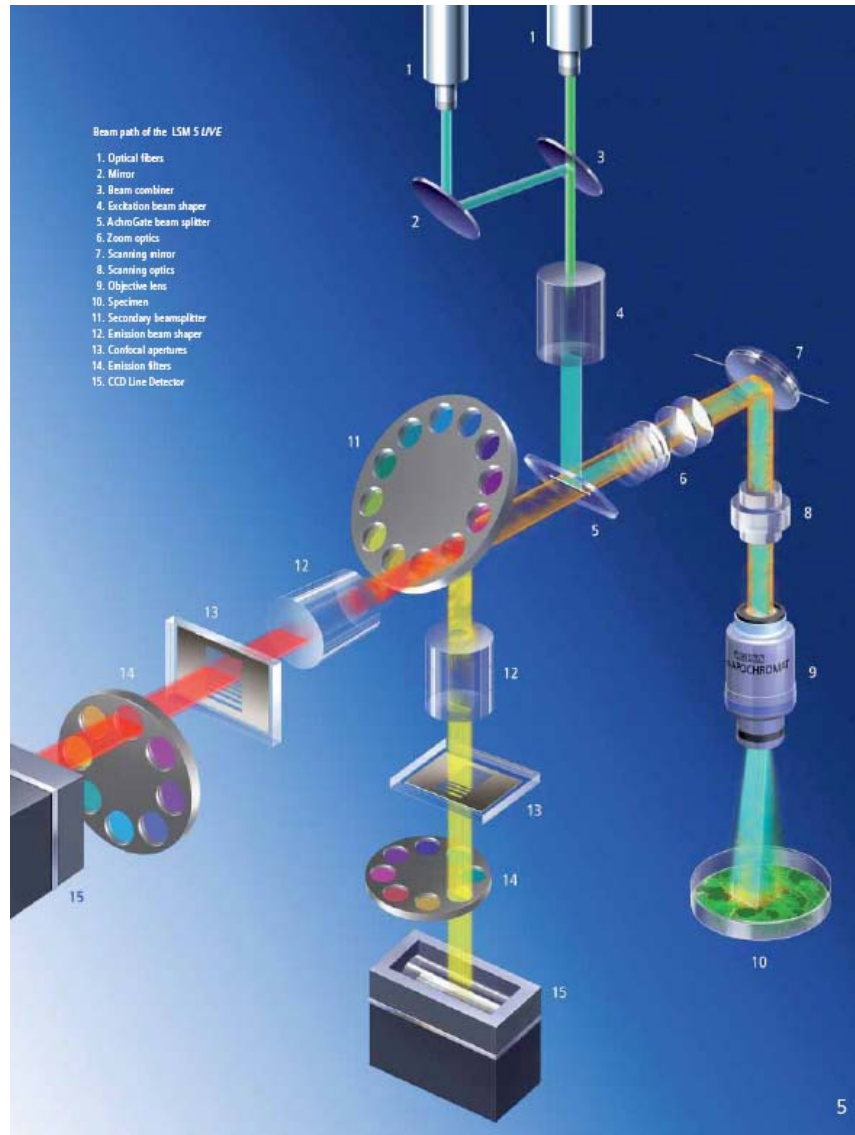
➤ 荧光显微镜技术、共聚焦显微镜技术、以及激光耦合和控制技术的发展，使得可以看清较厚标本的信息



➤ 双光子显微镜：用于活体和深层组织的观察

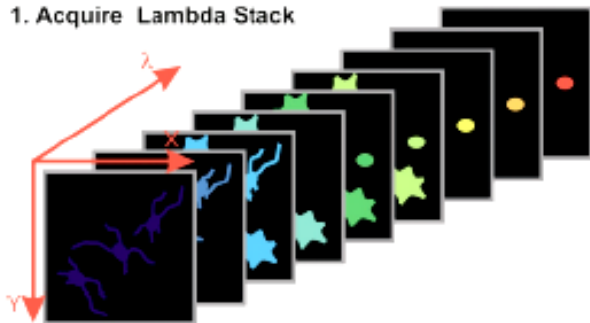


快速线扫描共聚焦显微镜

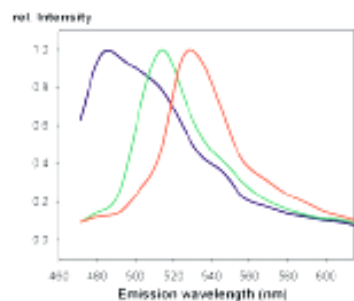


➤ 使用先进的光谱分离技术可以将发射光谱非常接近的荧光标记分开

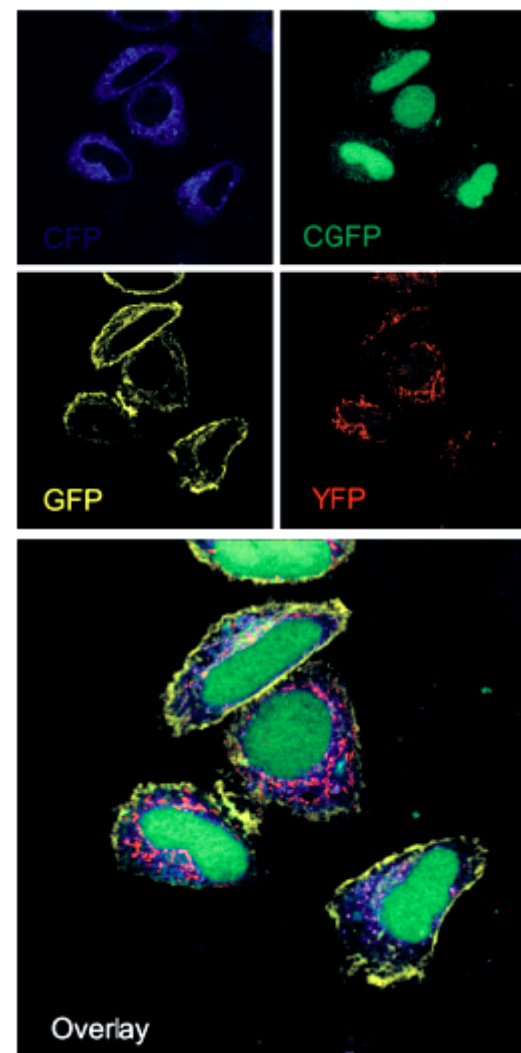
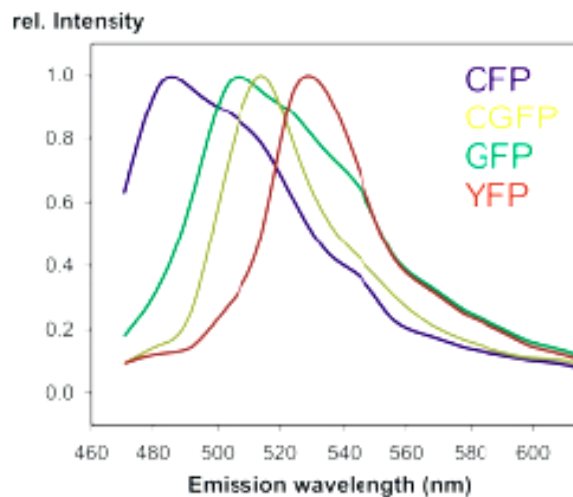
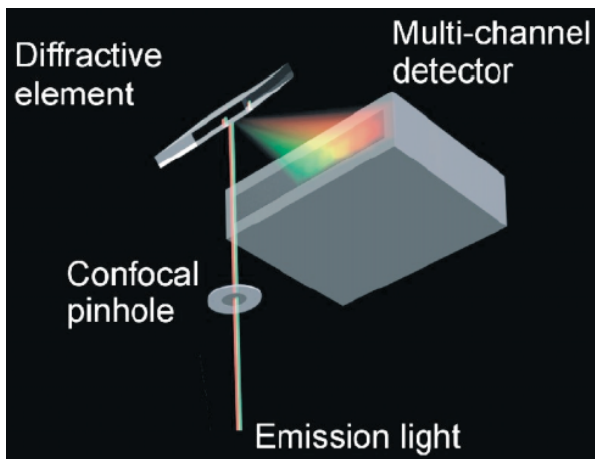
1. Acquire Lambda Stack



2. Select Reference Spectra

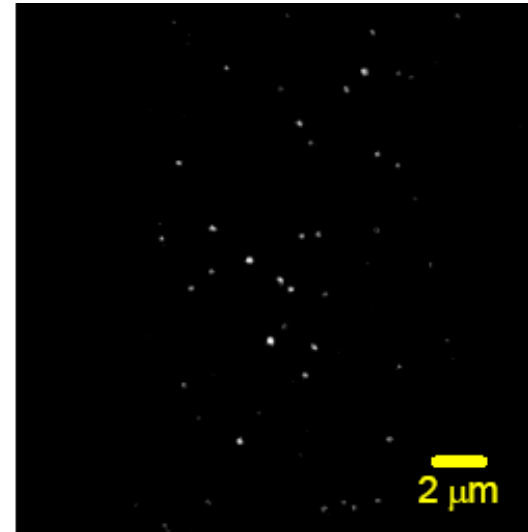
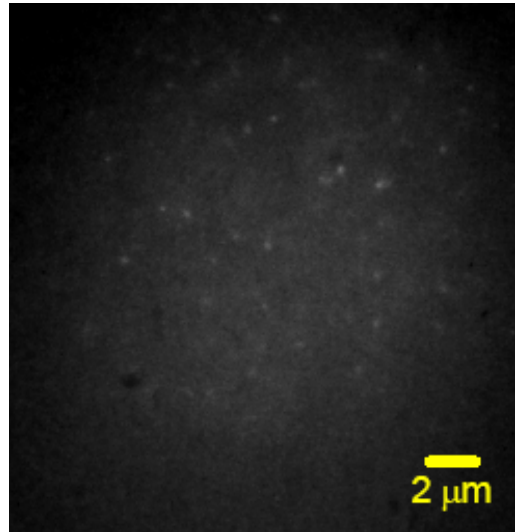
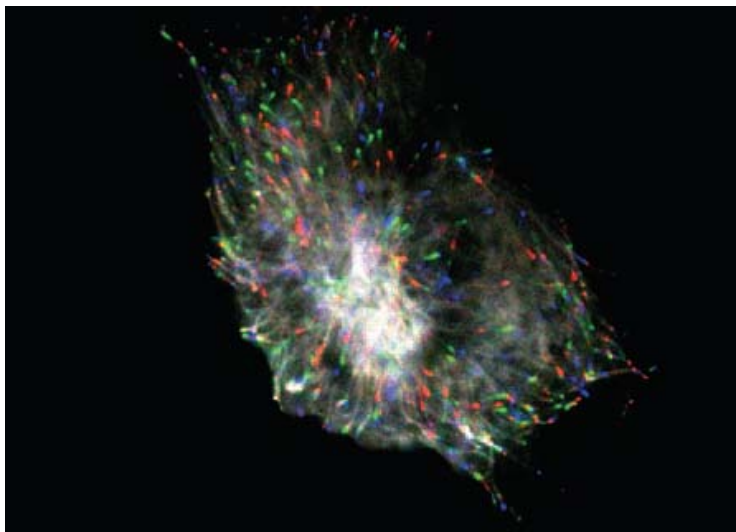
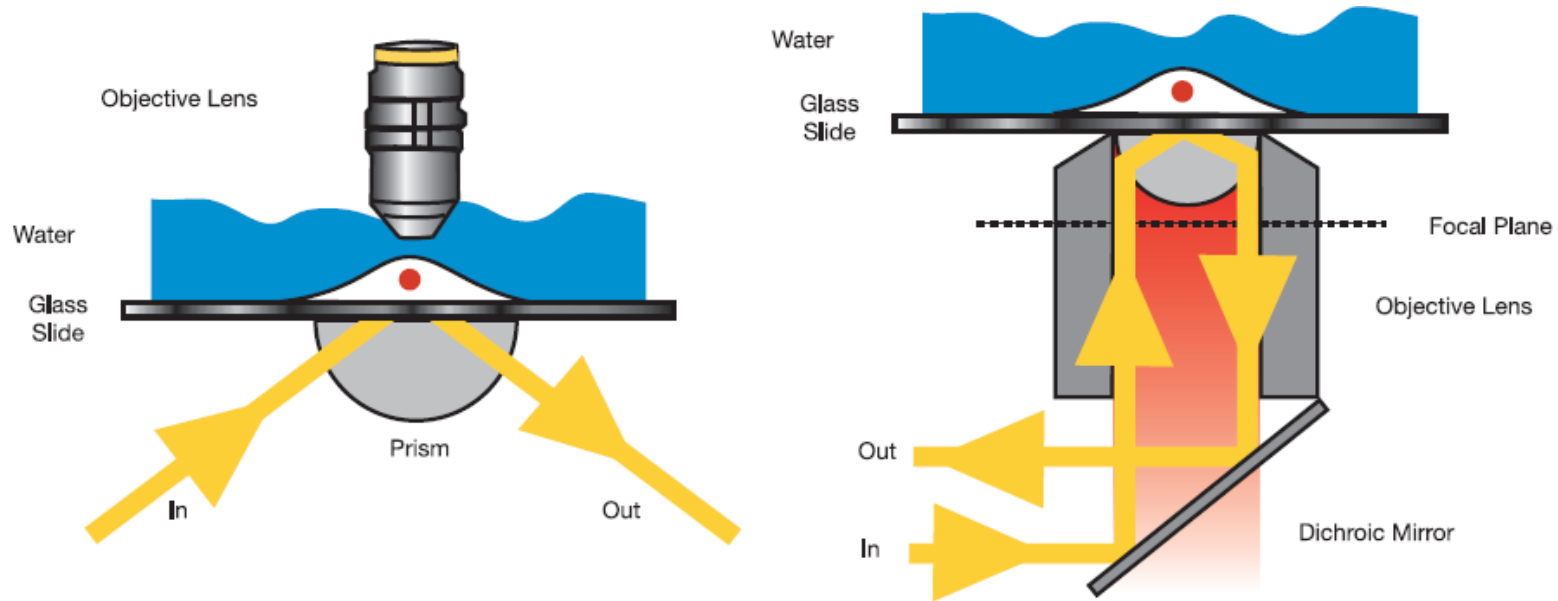


3. Perform Linear Unmixing



$$S(\lambda)_{\text{sum}} = \left[\text{Intensity}_{\text{dye A}} \cdot S(\lambda)_{\text{dye A}} \right] + \left[\text{Intensity}_{\text{dye B}} \cdot S(\lambda)_{\text{dye B}} \right] + \left[\text{Intensity}_{\text{dye C}} \cdot S(\lambda)_{\text{dye C}} \right]$$

➤ 全反射显微镜 (TIRF)：可用于观察盖玻片和标本界面 100 nm 处的荧光信号，用于细胞贴附、囊泡释放、以及单分子荧光研究



➤ STED 显微镜：进一步将光学显微镜系统侧向分辨率提高至 70 nm

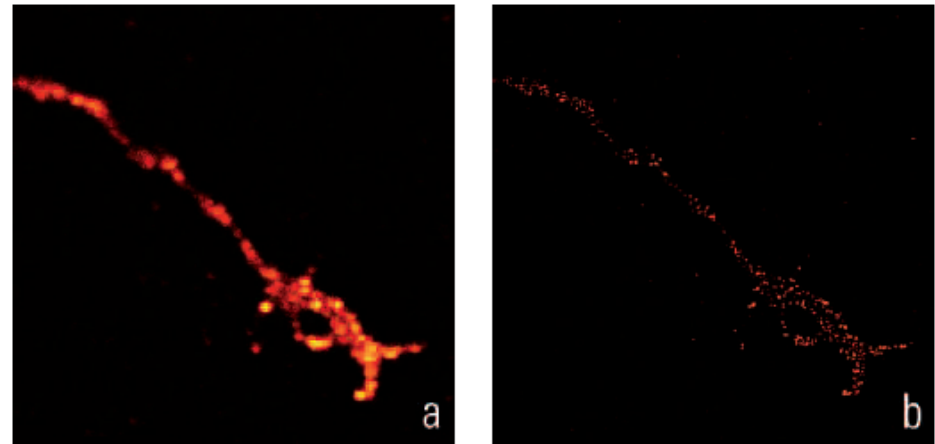
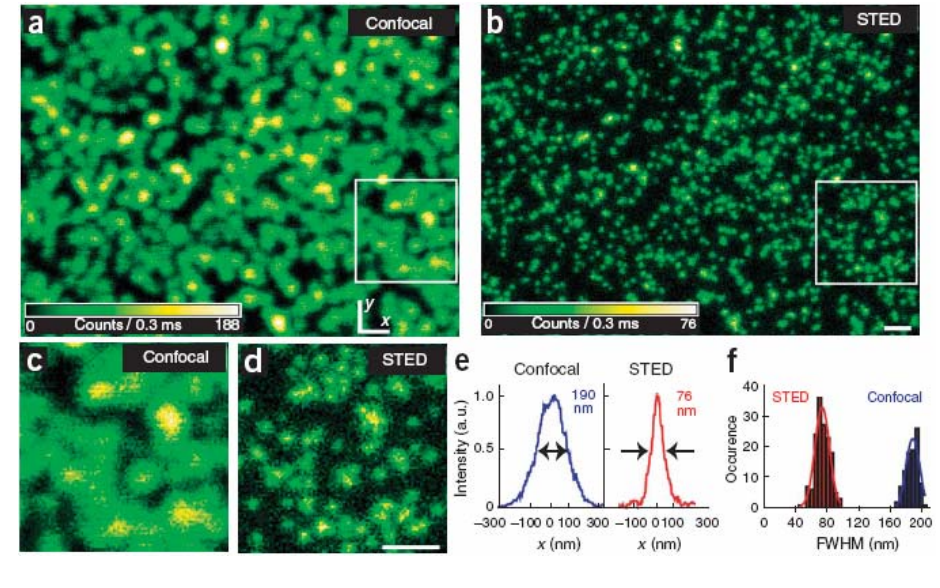
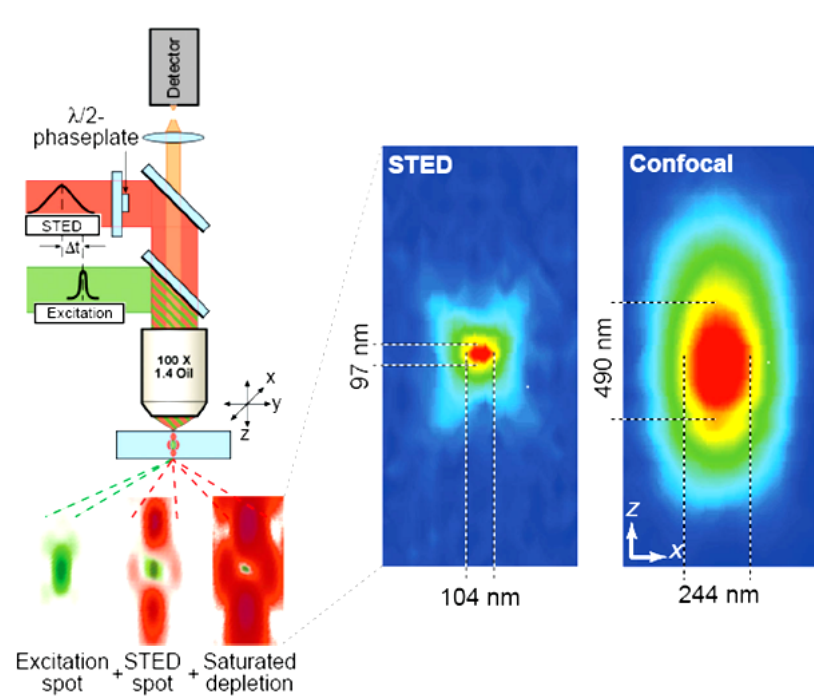


Fig. 5: *Drosophila* neuromuscular synapses. Liprin Protein, stained with ATTO 647N.

a) Confocal image

b) STED image, unfolded

The STED image resolves substructures in the presynaptic active zones. Courtesy of Stephan Sigrist, Würzburg, Germany

- 使用 4 Pi 显微镜技术，可提高图像的 Z-轴分辨率至 100 nm，获得高分辨的三维图像

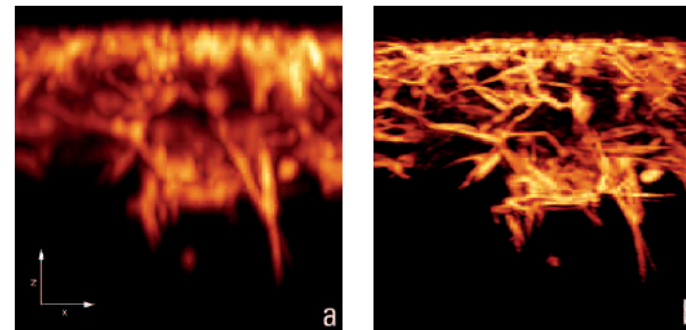
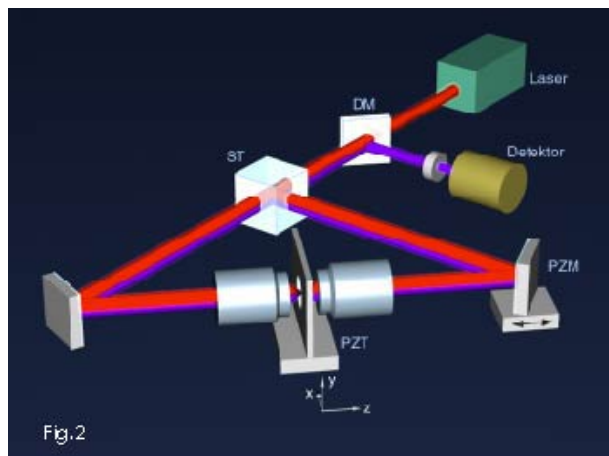
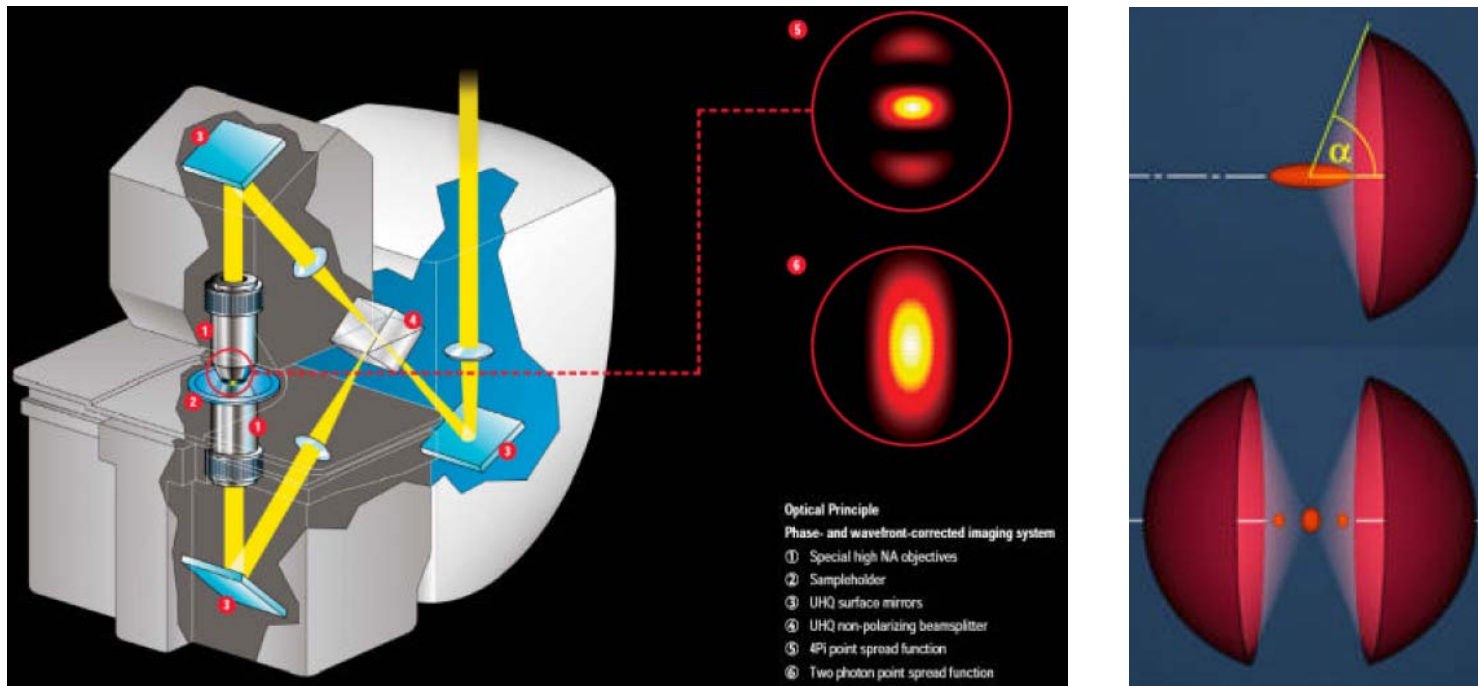
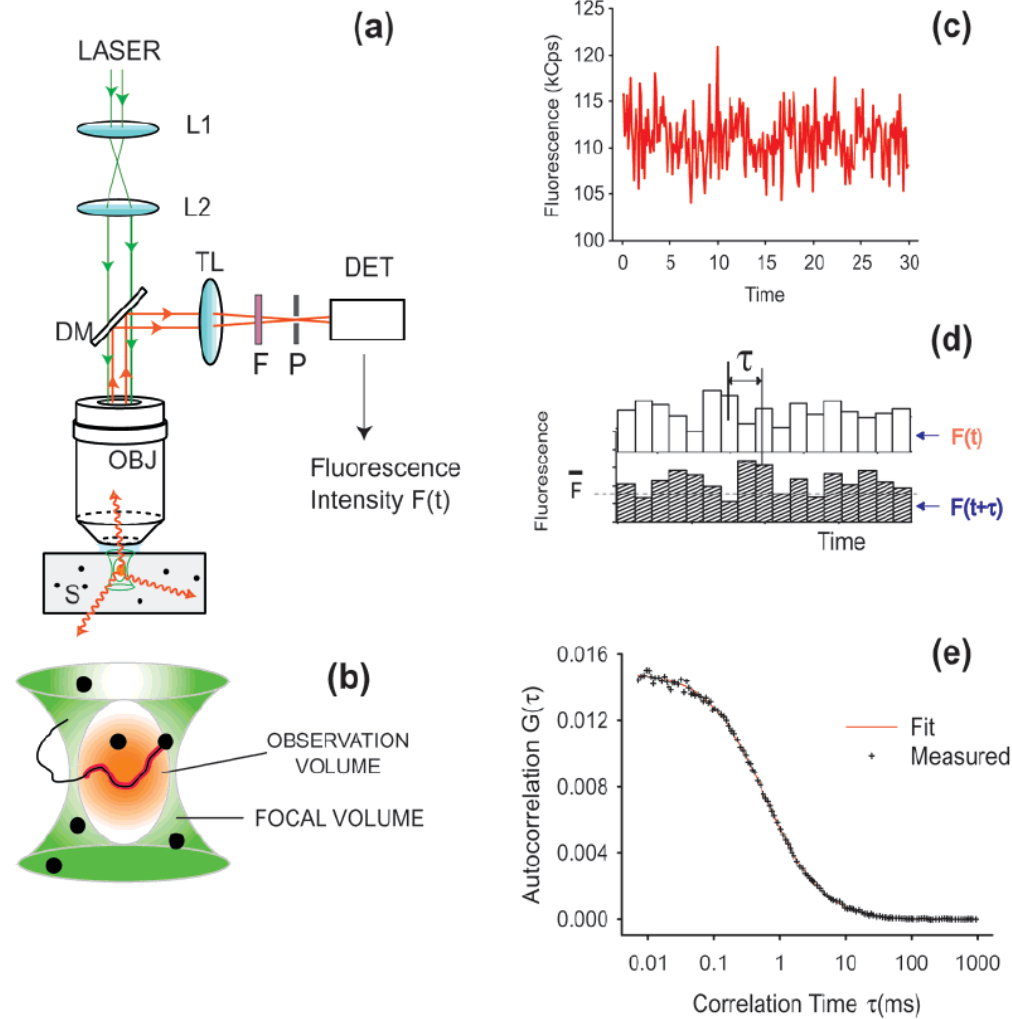
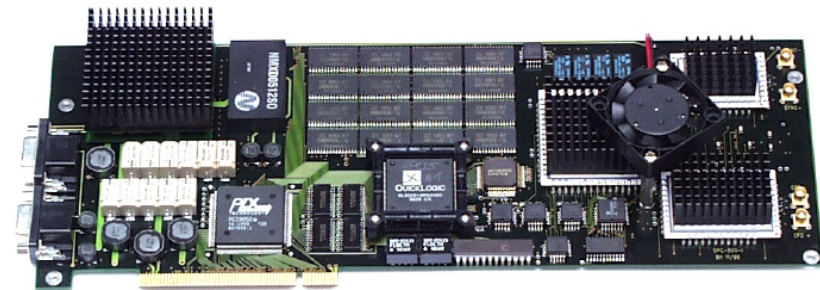
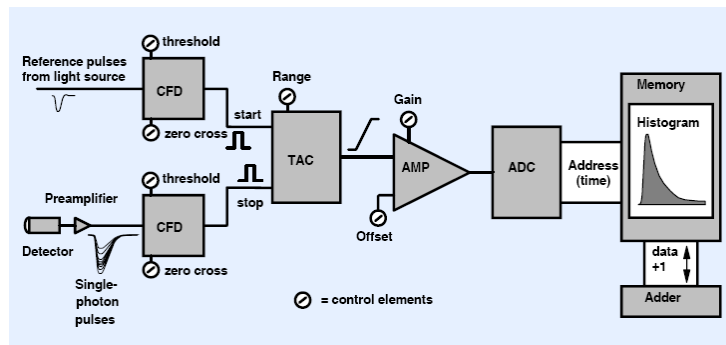
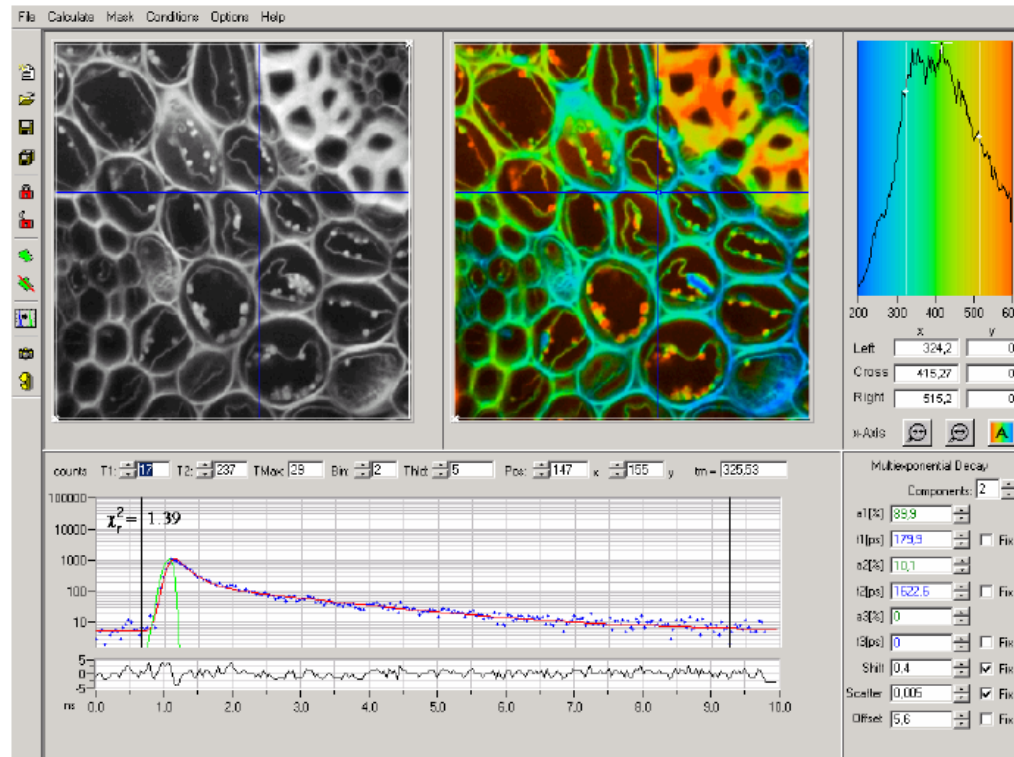


Fig. 2: Axial resolution improvement by 4Pi microscopy
Immunolabelled Actin fibers of HeLa cells in xzy maximum projection. Single filaments can be easily separated with Leica TCS 4Pi.
a) Confocal image
b) 4Pi image

➤ Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)：荧光相关光谱显微镜，通过研究生物标本中低浓度蛋白分子的运动，测量蛋白分子的浓度、扩散、以及结合的情况



➤ Time-correlated single photon counting (TCSPC): 时间相关单光子计数技术，用于测量荧光分子的荧光寿命 (Fluorescence Lifetime)



斑马鱼大脑血管重构

