

显微镜技术

显微镜是用来观察、记录和研究经过制片技术处理后被检物体细微结构的最主要的光学精密仪器。它广泛地应用于各学科领域中。这对微观世界的探索及理论的研究起着极其重要的作用。

显微镜的种类繁多，不仅因制造年代和不同国家的产品有不同类型，而且在结构造型及功能等方面亦各异。一般的，根据照明光源的性质来分可分为“光学显微镜”和“非光学显微镜”。光学显微镜是利用人眼可见的可见光或紫外线作为光源的，它分为单式显微镜和复式显微镜。其中单式显微镜制造简单，放大率及性能均不高，它是由一块或几块透镜组成，如：放大镜、平台解剖镜；而复式显微镜则是由多组透镜组合而成，并可根据结构、原理和应用范围的不同分多种类型，如：常规普通复式显微镜、专用或多用特种显微镜（荧光和倒置显微镜）及大型多用途的万能显微镜。非光学显微镜不是利用人眼可见的可见光或紫外线作为光源的，而是利用电子束作为光源并且是以“电磁透镜”作透镜的，因而也称电子显微镜。

一、光学显微镜

光学显微镜（light microscope）简称显微镜或光镜，是利用光线照明使微小物体形成放大影像的仪器。目前使用最广泛的是普通光学显微镜，此外还有相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜和倒置显微镜等。

（一）普通光学显微镜

1、原理

普通光学显微镜的基本工作原理是利用物镜和目镜的多组凸透镜将物像逐级放大并反射到视网膜上的过程。（如图 1-1）。而显微镜性能和质量的高低可通过分辨率、数值孔径、放大率及焦点深度、视场直径等指标来反映。

分辨率（resolving power）即显微镜的分辨本领，是指显微镜或人眼在 25cm 和明视距离（能看清物像的最佳标准距离）处所能清楚分辨被检物体最小间隔的能力。它主要由物镜的分辨率所决定而与目镜无关。具体公式如下：

$$R = \frac{0.61\lambda}{N \cdot A} = \frac{0.61\lambda}{n \cdot \sin\alpha / 2}$$

其中 λ 为照明光源的波长，如白光 $\lambda \approx 0.5\mu\text{m}$ 。n 为介质的折射率，如空气 $n=1$ ，玻璃=1.52，

香柏油=1.51，石蜡油=1.46。 α 为镜口角，它是指在工作距离处位于物镜光轴上标本中的一个点所发出的光线到物镜的前透镜有效直径两端所形成的夹角（图 1-2）。可见通过降低波长、增大介质折射率和加大孔径角及增加明暗反差是提高分辨率的有效手段。

数值孔径（numerical aperture , NA.）也称镜口率，是直接决定显微镜分辨率的一个重要参数，其公式为： $N\cdot A=n\cdot\sin\alpha/2$ ，其中镜口率数字越大，表示分辨力越高。

放大率（minifying power）即放大倍数，是光镜性能的另一重要参数。它主要有 4×、10×、40×和 100×四种，其中 4×和 10×为低倍镜，40×为高倍镜，100×为油镜。另外，镜头长度随倍数的增加依次增长，而在不同放大倍数的物镜筒上还标有不同颜色的环，以用于区别。

低倍镜、高倍镜以空气为介质，而油镜需以香柏油或石蜡油为介质。这样就避免了由于油镜镜孔小，而使进入物镜的光线产生折射，从而导致视野暗淡，物像不清现象的发生。一台显微镜的总放大倍数等于目镜放大倍数与物镜放大倍数的乘积，如目镜 10×，物镜为 40×，其放大倍数为 $10\times 40=400$ 倍。常用显微镜的最大放大倍数为 1600×。物镜和目镜的放大倍数可用下列公式计算：

$$\text{物镜放大倍数} = \frac{\text{镜筒长度}(110\text{mm})}{\text{物镜焦距}} \quad ; \quad \text{目镜放大倍数} = \frac{\text{明视距离}(250\text{mm})}{\text{目镜焦距}}$$

焦点深度（focal depth）即当显微镜对标本的某一点或平面准焦时，焦点平面上下影像清晰的距离或范围。一般的焦点深度越大可看到被检物体的全层；反之，则只能看到被检物体的一薄层。公式为：

$$D = \frac{k \cdot n}{M \cdot NA}$$

其中， $K=240\mu\text{m}$ ， n = 介质折射率， M = 总放大率， NA = 数值孔径。

视场直径（Viewing field）也称视场宽度或视场范围，是指在显微镜下看到的圆形视场内所能容纳被检物体的实际范围，其中视场直径愈大，愈便于观察。

2、显微镜的结构

显微镜（Microscope）的主要结构是由三部分组成，即：机械部分、照明部分和光学部分（图 1-3）。

①机械部分

它是显微镜的支架结构，主要包括镜座、镜柱、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台和调节器。

1)镜座 (base): 它是显微镜的基座,用以支持整个镜体的平稳。它常呈马蹄铁形、圆形或方形,有的显微镜在镜座内装有照明光源。

2)镜柱 (post): 它是镜座向上直立的短柱,它常与镜座和镜臂相连,也具有支持作用。

3)镜臂 (arm): 它是与镜柱相连的结构,适于手握。有的显微镜(如:L1100型)的镜柱和镜臂合起来统称为主体。

4)镜筒 (tube): 它是附在镜臂前方的筒状结构,由金属制成,其上端装有目镜,下端装有物镜转换器。目前可根据镜筒数目,将光镜分为单筒式和双筒式两种。

5)物镜转换器 (revolving nose-piece): 它常装在镜筒的下端,呈圆盘状,分上下两片。上片固定在镜筒下端,其正后方有一固定卡;下片可自由转动,并且有3~4个螺旋孔,用以安装不同倍数的物镜。螺旋孔外缘处各有一个缺刻,当转换物镜时,下片的缺刻与上片的固定卡相扣合,此时物镜和镜筒同轴,便于观察。

6)载物台 (stage): 它是位于物镜转换器下方一个方形平台,用于放置玻片标本。台面水平并与显微镜的光轴垂直,在台面的中央有一圆孔称通光孔,是用来通透光线的。载物台上装有推进器,其左侧附有镰刀形的弹簧卡,用来夹持玻片标本;右侧有两个螺旋,扭动螺旋可使标本前后左右移动,利于观察标本。此外推进器上还有标尺,可用来确定标本在视野的位置。

7)调节器 (focusing adjustment): 它是装在主体上的螺旋状结构,分大小两个螺旋,呈套叠状。转动大螺旋(粗调节器)可使载物台快速和大幅度升降,从而将物像迅速收入视野,通常在低倍镜下寻找物像时使用;转动小螺旋(细调节器),可使载物台缓慢地升降,不易觉察,多在高倍镜或油镜下调焦时使用,以获得清晰图像。

②照明部分

在载物台的下方装有一套照明装置,它由集光器、滤光器和反光镜或电光源组成。

1)集光器 (condenser): 也称聚光器,它位于载物台的下方,由聚光镜和光圈组成,其作用是把光线集中到所要观察的标本上。在其左侧有一调节螺旋,可使集光器上升或下降,上升时可使视野亮度增强,下降时可使视野亮度减弱。

a.聚光镜: 是由一片或数片透镜组成,其作用相当于一凸透镜,可把光线进一步集中在标本上,以增加标本的亮度。

b.光圈: 又称可变光阑或孔径光阑,位于聚光镜的下端由十几张金属薄片围成,中间有圆孔,光圈的外侧有一小柄,推动小柄可调节光圈孔径的大小,以改变视野的亮度。

2)滤光器 (filter): 它常安装在光圈下方,由滤光片和滤光架构成,其作用是在观察标

本和显微摄影时，选择某一波段的光线，而排除不需要的光线。

3)反光镜 (eflection mirror): 它位于集光器下方，常与镜柱相连，可随意转动，其作用是改变光线的方向和调整光线的强弱。它由两面构成：一面平展，一面凹陷。当光强时，用平面镜；而当光弱时，则用凹面镜。在电光源显微镜中，光线可通过镜座中装有的反射镜或反射棱镜反射到集光器中。

4)光源 (light): 显微镜的光源有自然光源和电光源两种。自然光源是由太阳折射所发出的光；而电光源则是由日光灯或白炽灯等所发出的光，其作用是显微镜提供光线。

③光学部分

它是显微镜的最重要部分，主要由目镜和物镜构成。

1) 镜 (ocular): 也称接目镜，它位于镜筒的最上端，其上标有放大倍数。一般说来，每台显微镜都配有 2—3 个目镜，用于观察不同放大倍数的需要。在目镜内常装有一指针，用以标示标本的位置，另外在目镜筒下方还有一挡片是用于安装目镜测微尺的。

2) 镜 (objective): 又称接物镜，它常装在镜筒下端与物镜转换器的螺旋孔相连，一般有 3—4 个。在镜筒侧面常标有主要性能指标，如放大倍数、镜口率、镜筒长度和所需要盖片厚度。常用显微镜物镜的表示方法如图 1--4。其中 10、40、100 表示放大倍数，0.25、0.65、1.25 表示镜口率，160 表示镜筒长度，0.17 表示盖片厚度，单位为毫米。镜筒长度是指从目镜筒上缘到物镜转换器螺旋口下端的距离。另外，工作距离是指在观察标本，并把物像调到最清晰的程度时，物镜下表面与盖片之间的距离。物镜的放大倍数越大，其工作距离越小。

(二) 显微镜的使用方法

1、低倍镜的使用方法

(1) 准备:

1、右手握镜臂，左手托镜座，将显微镜从镜箱中取出，镜筒朝前放在自己座位前方偏左的实验台上，使镜座后缘距台边 6—7cm。

2、适当调整座位的高度，使操作者能舒适坐着进行操作。

3、检查显微镜的各个部件是否完整和正常。

4、向内转动粗调节器，使载物台略为上升，再转动转换器，让转换器边缘的缺刻与固定卡相扣合，以使低倍镜的光轴对准镜筒中心和通光孔。

5、打开光圈，上升集光器。

(2)对光: 从目镜观察，同时两手转动反光镜，使镜面正对光源，直到镜内出现均匀且亮度适中的圆形亮光，这个发亮的范围称为视野。

(3)放置标本：左手取所观察的玻片标本，将有盖玻片的一面朝上，从显微镜左侧放到载物台上；右手用弹簧卡卡住载玻片，然后转动推进器螺旋将所要观察的标本调至通光孔的中央。

(4)调节焦距：调焦是初学者较难掌握的一步，必须反复练习，才能熟练掌握。为了能得到清晰的物像，必须调节物镜与标本之间的距离，使它与物镜的工作距离相符合，这种操作叫调焦。首先，眼睛从侧面注视低倍镜，双手内旋粗调节器，使载物台缓慢上升直到物镜的工作距离为 3mm。然后，一边从目镜观察，一边用手外旋粗调节器，使载物台缓慢下降或物镜上升，直到视野内出现清晰的物像为止。

(5)注意：这一操作过程有四种可能视野内不见物像：

- ① 要观察的标本不在视野内，这需要调整玻片位置。
- ② 焦距没有调好，物镜头与玻片标本间的距离大于或小于低（高）倍镜的工作距离，这需要重新调节焦距。
- ③ 标本太小，需用推进器反复找或更换标本。
- ④ 标本的颜色浅或透明，这应调节聚光镜或光圈，使视野变暗。

2、高倍镜的使用方法

在使用高倍镜之前，必须在低倍镜下找到清晰的物像，并把欲放大的部位移到视野的正中央。然后从侧面注视，右手转动转换器，换上高倍镜，再用眼观察，此时大都能见到一个不太清晰的物像。接着再用细调节器调节焦距，直至见到清晰的物像。注意，如果不出现物像或物像模糊，可查看切片是否放反了或切片过厚以及物镜是否松动或被污染等情况后重新操作。

3、油镜的使用方法

(1)在使用油镜时，必须先经低、高倍镜观察找到合适部位和清晰的物像，并将要进一步放大仔细观察的部位移到视野中央。然后从侧面注视，转动转换器，使物镜头离开通光孔，并在需要观察部位的盖片上加一滴香柏油，换上油镜头，使其浸在油滴中再用眼观察，同时转动细调节器并开大光圈，直到出现清晰的物像。

(2)使用注意：在转动转换器时，一定要认清油镜以免污染其他镜头。另外油镜使用完毕后，载物台下降，把油镜头转离光轴，用蘸有二甲苯的擦镜纸将镜头上和带有盖片的切片上的香柏油擦去。无盖片的切片，在其上滴一滴二甲苯后，用清水冲洗。

（三）使用显微镜应注意的事项

(1)搬动显微镜时，应轻拿轻放且必须一手握镜臂，一手托镜座，紧贴胸前，以防目镜、

反光镜等零件脱落或与其他物体相撞。

(2)显微镜上的各部件不准随便拆卸或串换,以免丢失或损坏。每次使用前后都要仔细检查,发现问题及时向老师汇报。

(3)在转换物镜时,一定要旋转转换器,不可用手直接搬转物镜,以防造成目镜与物镜的光轴不合,影响观察。

(4)要保持显微镜的清洁,不用时应放入镜箱或用绸布遮盖。如在使用过程中有污染,须及时清除:机械部分要用绸布擦拭,而光学及照明部分则用擦镜纸擦拭。

(5)在观察标本时,必须养成双眼观察和双手并用的习惯,同时注意玻片标本移动方向与视野内物像移动方向是相反的。

(6)显微镜用完后,应将标本取下,并将聚光器下降约 1cm,同时把物镜转离通光孔,再送回镜箱。

(7)在任何时候,特别是在使用高倍镜或油镜时,都不能一边在目镜中观察,一边用粗调节器上调载物台,以免镜头与切片相撞,损坏物镜头及切片。

(四) 显微镜的保养与维护

(1)显微镜应放置于阴凉、干燥、无灰尘和无酸碱蒸气的地方。为防止灰尘浸入,不用时可用塑料套把仪器全部罩住。

(2)所有镜头均经过校正,不得自行拆开。如有灰尘沾在镜头上可先用吹风球(洗耳球)将灰尘吹去,再用毛笔拂除,油污可用清洁的软细布蘸二甲苯将镜头玻璃轻轻擦净。

(3)显微镜各机械部分上如沾附灰尘,也应先将灰尘排除,然后用清洁的细软布擦干净。如果是无漆的滑动部分,应随即涂上薄薄一层无腐蚀性的润滑剂。在清洁显微镜时要特别注意不要碰到光学零件,尤其是物镜。

(4)粗动调焦机构如发现太紧或太松时,可用一手握紧一只粗调焦手轮,一手旋转另一支手轮,太紧时将手轮旋松,太松时将手轮旋紧。这时适当地调节,可使调焦机构松紧适宜。

物镜用后必须装入物镜盒中,以防碰损和沾污。为防止灰尘落入镜筒中,用完后将目镜罩装入。

二、暗视野显微镜

暗视野显微镜,由于它能观察到普通光学显微镜下所看不到的微粒,所以,亦称超显微镜或限外显微镜。暗视野显微镜可以用来研究活细胞,例如:观察介质中的细菌、酵母和霉菌;观察白血细胞及血清中分子的布朗运动和血细胞的状态;观察活细胞的结构和线粒体的运动、胶体颗粒等。此外,如果它跟显微灰化法结合起来,则可以用来研究无机盐在细胞中

的分布。

(一) 实验原理

1、丁达尔(Tyndall)现象

暗视野显微镜是以丁达尔(Tyndall)效应即以胶体粒子的反射和散射现象为基础设计的。丁达尔现象是指光通过浑浊媒质(如烟、雾、悬浮液和乳状液等)时，浑浊媒质所呈光的强烈散射现象。比如灰尘细粒本不能为我们肉眼所见，若在明视野用强光通过的方法来观察，有些粒子遇光后发生散射现象，但因光线太强和发生绕射现象等而看不出来。如果把光线斜照它们，并衬以暗的背景，则因粒子与光线发生散射的结果，尘粒成为可见。例如：室内本有许多灰尘飞扬，可是我们看不见，但在暗的房间中若有一束光线从门缝斜射进来，便粒粒可见了。

2、暗视野显微镜的基本原理

暗视野显微镜是应用了特殊聚光器，使光柱不能由下而上的通过标本，从而防止了强度很大的光线直接进入物镜。它是将光线倾斜地照射在要观察的标本上，当标本遇光线发生反射或散射时，其散射的光线投入物镜内，使观察者看到物象。即观察者视野内所看到的不是照射来的直接光线，而是被检物体所散射的光线。由于暗视野照明法是利用被检物体表面散射的光层而观察物体，所以只能看到物体的存在和运动，而不能分清物体的细微结构。但被检物体为非均质时，并大于 $1/2$ 波长，则各级衍射光线同时进入物镜，在某种程度上也可观察到物体的构造。

使用普通显微镜，在明视野中心照明下观察物体时，最大的分辨力仅为 0.2 微米，而在明视野斜射照明下，分辨力可再提高一倍。但在暗视野斜射照明下，虽看不清物体的细微结构，但它可以分辨 0.004 微米以上的微粒子，也就是说，用普通显微镜在明视野照明下看不到的 0.2—0.004 微米范围的微粒子，在暗视野照明下就能看到。

3、暗视野显微镜的结构

暗视野显微镜是用暗视野聚光器代替普通显微镜聚光器，并且所用物镜的镜口率一般小于 0.85，这样可使照明的光线不进入物镜，造成暗视野。它一般安装在镜台下的普通聚光器的位置。所以，普通显微镜只要聚光器是可以拆卸的，都可以改装成暗视野显微镜。

暗视野聚光器的种类很多，每一种聚光器也都有它的不同结构特点，都要求不同的物镜镜口率，因此，可以根据研究的目的加以选择。生物学和医学上最常用的暗视野聚光器有下面几种。

(1) 抛物面聚光器

这是玻璃球与轴垂直地切去上下两个部分制成的抛物体，使抛物面的焦点会聚在聚光器上被检物体位置。这种聚光器的下面有中央遮光板，以遮掉来自反射镜中部的光柱，而只让边缘的筒状光柱通过。抛物面涂有水银，从而使进入的筒状光束通过反射而改变其走行方向，并会聚于标本的位置上，再经过标本的散射进入物镜。

使用这种聚光器时，物镜的镜口率要小于 0.85，以避免直射光的进入。所用的载玻片厚度多数为 1.0 毫米左右。若聚光器带有调节焦点的把手，则可用厚度 0.7—1.7 毫米范围的载玻片。

(2)心形面聚光器

这是由涂有水银的心形回转面和球面组成的聚光器。聚光器底部也有遮光板。由边缘进入的光线从凸水银面反射到凹水银面上，再经反射改变其走行方向后会聚于标本上。这种聚光器对于光束的会聚接近于理想，能得到强烈的光线，但因焦点浅，使用时必须严格调节。所使用的载玻片厚度应不超过 1.2 毫米。物镜的镜口率不能使用大于 1.05。因为这种聚光器不仅对光束的会聚接近理想，而且对像差和色差的矫正也比较完善，因而在显微镜上可用来观察胶体粒子。

(3)明暗两用聚光器

又叫转换型聚光器，其原理与抛物面聚光器相同。可通过转换装置用暗视野或明视野照明。但作明视野照明由于不能充分利用镜口率，且不能作斜射照明，因而作精密的明视野观察时，最好换用普通的聚光器。这种聚光器和抛物面聚光器是最常用的暗视野聚光器。

(4)辉光聚光器

这是利用两个涂银的球面组成的聚光器。它的镜口角特别大，分辨力也很高，能用镜口率不超过 1.3 的油镜。常用于细菌、螺旋体等微小物体的观察。

另外，为了避免直射光进入物镜，这种聚光器有很大的镜口角，从而使光束能在玻璃上进行全反射。因此，该聚光器仅适用于折射率 1.4 以上的封埋剂封埋的标本。

(5)同心球面聚光器

这是由两个适当半径的涂银同心球面组成的，以球面反射照明光线的聚光器。它可根据焦点位置的不同分为两种类型。一种是用聚光器上面聚焦；另一种是在中央凹部聚焦。这种聚光器对光束的聚焦和像差、色差的矫正都比较完善，性能很强。

4、暗视野显微镜的用法

(1)把暗视野聚光器安装在载物台下的聚光器支架上。并选用强的光源作照明。

(2)在聚光器和载玻片之间加上一滴香柏油。否则照明光线于聚光镜上面进行全反射，从而达不到被检物体，得不到暗视野照明。

(3)要把聚光镜的焦点对准物体。首先,要使聚光器的光轴与显微镜的光轴严格地在一直线上。如果聚光器有中心调节,则可利用;如果没有这种装置,则调节物镜。调节物镜的位置仅局限于横插式或夹子式的物镜转换装置。当调节聚光器到中心后,升降聚光镜并把焦点对准物体,即以圆锥光束的顶点照射物体。

(4)调节焦点,操作方法同明视野观察,但要注意载玻片的浓度适合于选用的聚光器类型,并且注意载玻片和盖玻片要清洁无损,以防乱反射。

(5)必须根据聚光器的类型选用合适镜口率的物镜,另外也不可在物镜和盖玻片之间加油,否则将变成明视野,达不到暗视野显微镜的目的。

三、荧光显微镜

荧光显微镜技术(Fluorescence microscope technology)是用人眼不可见的一定波长的紫外线($\lambda=365\text{nm}$)或短光波的蓝紫单色光($\lambda=420$)作激发光源照射被检物体,使之受激发后而产生人眼可见的荧光,然后再经显微镜成像系统放大来进行镜检。荧光显微镜技术是生物学和医学的重要研究手段,如对生物组织、生理、病理、微生物、医药、食品、化学等诸方面的鉴定等。另外,由于它染色简便,标本呈彩色图象且敏感度高,因而在细胞生物学研究中也广泛应用。

(一) 原理

荧光显微镜的基本工作原理与荧光产生有直接关系。

1、荧光:

普通光是由发光体质点的热运动所引起的辐射;而荧光是非温度辐射,是一种冷光。荧光有多种,如光化荧光(由光源激发而产生的荧光)、放射荧光(由放射性物质激发而产生的荧光)、生物荧光(生物体发出的荧光)、化学荧光(如磷的氧化时发出的荧光)等等。荧光显微镜既是利用“光化荧光”这一原理设计制造,从而达到荧光显微镜技术的镜检目的。

由于荧光显微镜的光源是利用人眼不可见的短波光——紫外线,因而就大大提高了物镜的分辨率,图象与背景的反差亦甚为明显。

2、荧光现象:

将荧光物体放到光谱中的各色区域,就可发现引起荧光最有效的光线是光谱上波长较短的区域,即近紫外线区域,波长约为 320 — 400nm。这种现象的实质是分子吸收了短波光的能量(波长越短,光能越强),又以发光的形式以波长较长的荧光射出,而为人眼可见,这就是“荧光现象”。荧光接近可见光的红光端,大部分的荧光现象是符合这一规律的。荧光现象可分为两种:

(1)第一次荧光现象：

又称“固有荧光”或“自发荧光”即当某些物质在紫外线的照射下可发出可见光，如细胞内的叶绿素经紫外线照射后能发出红色的荧光。

(2)第二次荧光现象：

又称“继发荧光”或“诱发荧光”，即当某些物质经紫外线照射后不能或只部分发生微弱的荧光，因而就需要先用荧光素处理后，再经紫外线照射使之发生荧光，这是因为组织内吸附或溶解有荧光素的缘故。

荧光色素的种类甚多，大部分为制片技术中所用的染色剂。它对各种被检物体表现出不同的亲和性。因此，对荧光色素的选择、应用浓度及处理时间等诸方面都需摸索和积累经验。

表 1. 常见的荧光色素及应用

名 称	浓 度%	处理时间(min)
6Y 绽橙	0.1 — 1.0	0.5—3
荧光红	0.1—1.0	0.5—3
伊红 Y	0.1	1—2
金色胺	0.1—1.0	0.5—3
酸性品红	0.1	1—2
玫瑰红 8	0.1	1—10
玫瑰红 0	0.1—0.001	1—3
甲基绿	0.1—0.01	1—3
刚果红	0.1	1—2
中性红	0.1—0.005	5 —数小时
硫酸黄连素	0.1—0.002	1 —数小时

注：被检物体经荧光色素处理后，荧光色基本上与荧光色素的额色相似，但在不同波长紫外线的激发下，其颜色也各异。

3、激发滤色镜

生物体的各种组织、不同的细胞、细胞器；微生物、病毒等等，对激发光的选择是很重要的，这可利用不同的激发滤色镜来达到最佳的激发光源。在荧光色素的应用上也如此，必须应用适合某种被检物体的荧光素，才能获得满意的观察效果。

表 2: 激发滤色镜与荧光色素的应用

激发方法	激发光主波长	应用范围
UV 激发	334nm 365nm	①一般病理细菌异硫氰荧光素染色自发荧光观察 ②一般荧光抗体法观察
V 激发	405nm 435nm	①邻苯二酚胺、5-羟基色胺等的观察 ②四环素染色牙齿和骨质的观察研究
B 激发	405nm、435nm 和 490nm 附近的连续光谱	荧光抗体法：免疫学 ①丫啶橙（黄）染色：癌细胞、红血球、蛔虫等的观察 ②金色胺染色：结合菌检查 ③喹丫因染色：染色体的观察研究
G 激发	546nm	孚尔根染色：细胞内的研究

（二）荧光显微镜的装置

荧光显微镜在装置上的重要部件就是要有能提供充分的特定波长的光源装置，使被检物体得到理想的激发而发出强的荧光。为达到这一要求，均借助滤光片把激发光的光谱限定在这一特定的波长区域内，而把伴随发出的可见光全部吸收或反射掉。此外，为了提高荧光镜检的效果，对聚光镜(透射式用)、载玻片、盖玻片和物镜均有一定的要求。

荧光显微镜的装置有透射式和落射式两种类型。

(1)透射式：

激发光来自被检物体的下方，聚光镜为暗场聚光镜，使激发光不进入物镜，而使荧光进入物镜。它在低倍情况下明亮，而高倍则暗，在油浸和调中时，较难操作，尤以低倍的照明范围难于确定，但能得到很暗的视场背景。透射式不适用于非透明的被检物体。

(2)落射式：

新型的荧光显微镜多为落射式，即在光路中具有分光镜，光源来自被检物体的上方故对透明与非透明的被检物体都适用。由于物镜起到了聚光镜的作用，不仅便于操作，而且从低倍到高倍，可以实现整个视场的均匀照明，但它在低倍情况下则暗，而高倍则明。

（二）荧光显微镜的样品制作

样品的制作与一般制片方法相同，但以新鲜材料为好，否则材料经各个制片步骤处理后，往往使固有荧光增强或消失，其要求：

(1)不要用本身能产生荧光的药剂，一般用酒精、甲醛作固定剂，但时间不宜过长(甲醛能使组织发出青绿—青白色荧光；酒精、苯、丙酮等时间一长可使荧光物质大量溶出；苦味酸本身有固有荧光，不能使用)，甲醛以甲醛气进行固定为好。

(2)不能太厚，约在 $10\mu\text{m}$ 左右，尤以透射式荧光镜检时要求更甚。

(3)蛋白粘贴剂不能用以荧光色素处理的材料，因蛋白能为荧光色素染色，而发生附加荧光。

(4)如为石蜡制片，脱蜡必须彻底，因石蜡有青色荧光，切片进入水后，应充分水洗，再经荧光色素处理，用水封固进行镜检。

(5)载波片、盖玻片最好为萤石玻璃制成，如为普通玻璃，要色泽洁白，厚度要符合标准。同时不能有灰尘及有机物质，否则将会发生荧光而干扰正常的镜检效果。

(6)不能用加拿大树胶作封固剂，因其本身具有青黄色荧光，可用甘油、甘油胶、糖浆及阿拉伯树胶封固。

(三) 荧光显微镜的使用注意事项

(1)激发光长时间的照射，会发生荧光的衰减和消头现象，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源。

(2)作油浸观察时，应用“无荧光油”，尤其是在 U、V 激发时因香柏油带有青色荧光。

(3)荧光几乎都较微弱，应在较暗的室内进行，新型的目镜带有遮光罩，拔出可遮挡外来光的干扰。

(4)作荧光显微照相时，尽管肉眼观察镜象亮度与普通镜检相差无几，实际上曝光时间要增加数倍甚至几十倍，而且应使用特快片，如 200ASA(24DIN)、400ASA(27DIN)的感光片。此外，对于老式荧光显微镜，还应注意残余的紫外线是否彻底滤掉，否则由于感光片对紫外线特别敏感，而照不出荧光象。

(5)因照明光源含有紫外线，应避免直接看到照明光源，常在载物台前上方有黄色遮光板予以保护，以防紫外线损伤视网膜。

(6)电源应装置稳压器，否则电压不稳不仅会降低高压水银汞灯的使用时间而且也会影响镜检的效果。