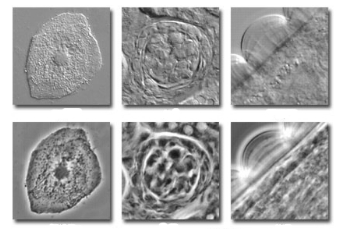
相衬显微镜（phasecontrastmicroscope）又称相差显微镜。在光学显微镜的改进过程中，相衬显微镜的制造成功和普遍的应用，是近代显微镜技术中的重要成就。在1935年荷兰学者泽尼克（P.Zernike）提出了相衬法原理，至1941年由德国蔡司工厂诞生了世界上第一台相衬显微镜。它的产生，使人类的视觉在光学显微镜下又得到新的扩展。从信息利用的角度来看，人们将它视为光学信息处理概念下的第一个产品，因而获得了1953年诺贝尔物理学奖。

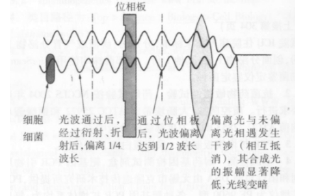
普通光学显微镜之所以看不见未染色的组织、细胞和细菌、病毒等活机体的图像，是因为通过样品的光线变化差别（反差）很小。标本染色后改变了振幅（亮度）和波长（颜色），影响了反差而获得图像。但是染色会引起样品变形，也可使有生命的机体死亡。要观察不染色的新鲜组织、细胞或其他微小活体必须使用相衬显微镜。

在显微镜下准确辩认各种正常和病理物质，是检验工作者的基本功。生物标本中的细胞、细菌等微小、透明的物体，对光的吸收率和折射指数等与周围的介质近似，在一般光学显微镜下，往往看不清其明显的轮廓和细致的内部结构。用特殊的染色法虽可清楚地看到细胞的形态和某些内部结构，但也有局限性。生物材料不经染色，在自然、活动的状态下能看清其形态和内部结构，是生物学界长期追求的目标。相衬显微镜就是适应这一要求而发展起来的一种特殊的显微镜装置。

相衬显微镜图案

相衬显微镜的基本原理

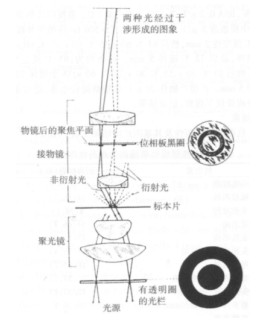
当一束平行光通过被检测标本，遇到一种物点时，由于各物点对光的吸收程度不同，在显微镜视场中可见到灰度(即明暗度)不同的各物点图像，这是由于光的振幅不同所致。如果标本中的物体近乎透明，视场中就看不出明显的灰度差别。但由于各种物点对光波产生了衍射和折射，使得通过的光波因延迟而发生了偏离，其光程就有了一定的差别，即产生了位相差。人眼不能分辨这种位相差，但可以设法将这种位相差转换成振幅差。相衬显微镜显微镜就是利用光的干涉原理，将位相差转换成振幅差(即明暗差)的显微镜装置。

相衬显微镜基本原理

当一束光通过标本时会遇到如下情况：一部分光通过物点，经过衍射等发生偏离；另一部分没有被衍射、折射的非偏离光，则均匀地投射于像平面上。偏离光与非偏离光之间的光程相差约1/4，但此时两者不会产生明显的干涉。如果在显微镜的物镜与目镜之间加一个位相板，使其相差再增加1/4(合计光程相差达1/2)，这时偏离光与非偏离光相遇，便产生明显的干涉(相互抵消)，两种光波相遇形成的合成波的振幅为两者之差，光线明显变暗。而标本的介质，只有非偏离光通过，不发生干涉。结果形成暗色的目的物和明亮的背景的图像。

相衬显微镜的结构

相衬显微镜与普通光学显微镜的基本结构是相同的。不同之处在于：①物镜镜头上面，在物镜第二焦平面装有一块圆盘状的位相板。②聚光器下面，在聚光器第一焦平面装有环形光束，光束上刻有狭窄的缝隙可通过环形强光。它具有四部分特殊结构：即环状光阑、相板、合轴调节望远镜及绿色滤光片。

相衬显微镜结构

1、相位板（annular phaseplate）

相位板位于物镜内部的后焦平面上。相位板上有两个区域，直射光通过的部分叫“共轭面”，衍射光通过的部分叫“补偿面”。带有相位板的物镜叫相差物镜，常以“Ph”字样标在物镜外壳上。

相差物镜是显微镜特有的重要装置。在相差特镜内的后焦面上装有种类不同的相位板。相位板由于前述的作用，造成视场中被检样品影像与背景不同的明暗反差，各具不同的效果。因物镜内相板种类或构成的不同，物镜在明暗反差上可区分为两大类，即明反差（B）或负反差（N）物镜和暗反差（D）或正反差（P）物镜。

同一反差类别的物镜，依放大率的不同，又可分为10×、20×、×40、和100×数种，因此，相关物镜种类颇多，一套可多达20余种。 相差物镜多为消色差物镜或平场消色差物镜（PL）。

2、转盘聚光器（turret condenser）

位于镜台之下，普通聚光器的所在位置上，由聚光镜和环状光阑（annular diapheragm）构成。环状光阑位于聚光镜之下，是一种特殊的光阑装置，由大小不同的环状通光孔构成，不同规格的通光孔——环状光阑装配在一个可旋转的转盘上，按需要调转使用。环状光阑的环宽与直径各不相同，与不同放大率的相差物镜内的相板相匹配，不可滥用。

3、合轴调中望远镜（centering telescope）

合轴调中望远镜简称CT，又名合轴调中目镜。它是眼透镜，可行升降调节，具有较长的焦距的一种望远目镜。镜筒较长，其直径与观察目镜相同。它的功用仅作为环状光阑的环孔（亮环）与相差物镜相板的共轭面环孔（暗环）的调中合轴与调焦之用。

相衬显微镜使用时，转盘聚光器的环状光阑与相差目镜必须匹配，且环状光阑的孔环与相差物镜相板共轭面的环孔在光路中要准确合轴，并完全吻合或重叠。以保证直射光和衍射光各行其路，使成像光线的相位差转变为可见的振幅差。但是，镜体的光路中前述两环的影像较小，一般目镜难以辨清，不能进行调焦与合轴的操作，非借助合轴调中望远镜不可。

4、绿色滤色镜（green filter）

相差物镜的种类，从色差消除情况来分，多属消色差物镜或PL物镜。消色差物镜的最佳清清晰范围的光谱区为510-630nm。欲提高相衬显微镜的性能最好以波长范围小的单色光照明，即接物镜最佳清晰范围的波长的光线进行照明。所以，使用相差物镜时，在光路上加用透射光线波长为500-600nm左右的绿色滤色镜，使照明光线中的红光和蓝光被吸收，只透过绿光，可提高物镜的分辨能力。滤色镜兼有吸热的作用，以利活体观察。

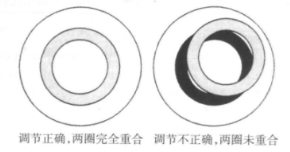
相衬显微镜图像的特点

相衬显微镜有暗相差（又称正相差）和明相差（又称负相差）之分，医学检验上一般多用暗相差。暗相衬显微镜下看到的细胞和细菌，与染色后的见到的大不相同。例如，新鲜血液中的红细胞显得暗而厚重，且细胞周围有一圈明亮的晕（一般细胞、细菌等外周均有一圈亮晕，红细胞最为明显）；中性粒细胞核不太明显，而胞浆中的颗粒却比较明显，与瑞氏染色结果恰恰相反。新鲜的血液中，还可以见到中性粒细胞的阿米巴样活动；细菌及其鞭毛、荚膜等明显可见。

相衬显微镜的使用

1、安装相差装置 将普通显微镜的聚光镜卸下，将带环状光栏的聚光镜装到相匹配的显微镜上;将显微镜的普通物镜卸下，换上带位相板的物镜；将目镜换成相衬显微镜专用的调焦目镜;在光源进光处放置专用的绿色滤光片（有时可以不用）。

2、对光和聚焦 通过调焦目镜和粗细调节螺旋的调节，直至视野中可清晰地看到有一个白圈和一个黑圈。黑圈是固定的，白圈则可通过聚光镜装置上的调节螺旋加以移动，使黑圈与白圈完全重合。取下调焦目镜，换上显微镜原来的目镜，即可进行检查。

相衬显微镜调焦

相衬显微镜的临床应用

相衬显微镜主要用于新鲜液体标本中细胞和微生物的检查,尤其适用于活细胞检查。一般是取新鲜液体标本,加上盖玻片(如用油镜时,还需在盖玻片上滴加镜油)立即进行检验。当前相衬显微镜主要用于以下几个方面：

1、血液学检验

用于血小板计数、血液中寄生虫检查和某些活细胞观察等。血小板体积小而透明,一般光学显微镜很难看清。新鲜血液直接用相衬显微镜检查,可以观察到疟原虫滋养体在红细胞内呈阿米巴样活泼运动。也可看到中性粒细胞和单核细胞的运动和吞噬细菌和异物(如碳颗粒)等现象。

2、尿分析

用于辨认新鲜尿中各种细胞和管型,特别是透明管型、白细胞、肾小管上皮细胞以及红细胞形态的分类等。

3、微生物学检验

用于不染色或染不上色的细菌、螺旋体、真菌孢子等的快速辨认,特别是对具有鞭毛、荚膜等特殊形态微生物的鉴别。

4、对活细胞的连续观察

在细胞培养过程中,不允许对培养细胞进行染色。为了对活细胞连续观察,必须在专用的倒置显微镜中加相差装置。

相衬显微镜使用注意事项

1、相位倒转 当n’<n或n’>n时得到象的明暗反差正好相反，称为相位倒转。当相位差δ=0时是无法识别的，随着δ的增大反差变大，当δ继续增大到某一值后会出现相位倒转。用90%高吸光值（高反差）物镜时，这个转变值约为0.55λ，用70%标准吸光值的物镜时约为0.33λ。较高吸光值的物镜应该用于分辨较小的光程差。

2、晕轮和渐暗效应

在相衬显微镜成象过程中，某一结构由于相位的延迟而变暗时，并不是光的损失，而是光在象平面上重新分配的结果。因此在黑暗区域明显消失的光会在较暗物体的周围出现一个明亮的晕轮。这是相衬显微镜的缺点，它妨碍了精细结构的观察，当环状光阑很窄时晕轮现象更为严重。相衬显微镜的另一个现象是渐暗效应，指相差观察相位延迟相同的较大区域时，该区域边缘会出现反差下降。

3、样品厚度的影响

当进行相差观察时，样品的厚度应该为5μm或者更薄，当采用较厚的样品时，样品的上层是很清楚的，深层则会模糊不清并且会产生相位移干扰及光的散射干扰。

4、盖玻片和载玻片的影响

样品一定要盖上盖玻片，否则环状光阑的亮环和相板的暗环很难重合。相差观察对载玻片和盖玻片的玻璃质量也有较高的要求，当有划痕，厚薄不均或凹凸不平时会产生亮环歪斜及相位干扰。另外玻片过厚或过薄时会使环状光阑亮环变大或变小。