

# 光学显微镜

## 实验要求：

### 1. 实验预习

每周答题开放时间为周日零点至周五 14:00。请于本人上课时间（当日 14:00 或 19:00）前，微信扫码二维码作答。**晚于上课时间提交的答卷不计分数。只允许填写一次<sup>[1]</sup>。**

每周六更换试题，届时所有答卷将被清空。由于更换试题前仅统计记录本周做实验同学的答卷成绩，特别提醒**本周内未轮到做实验的同学请勿提前作答<sup>[2]</sup>**。



**[1]** 同一微信、同一手机只允许填写一次。如同一姓名、学号有多份试卷，以时间最早的有效答卷计分。

**[2]** 例如：组内编号 13 号同学，第一周做衍射实验，应填写“衍射预习题”，第二周做显微镜实验，应填写“显微镜预习题”。如果在第一周就填写了“显微镜预习题”，则为“提前作答”，第一周结束，周六更换试题时，其“显微镜预习题”的答卷将被清空，且不被统计，为无效答卷。

### 2. 实验操作

- (1) 讲课结束前禁止打开、调节实验仪器；
- (2) 实验中请爱护实验设备，轻拿轻放，注意人身安全及实验仪器安全；
- (3) 如实记录实验数据，**编造、篡改实验数据一经发现判零分。**
- (4) 实验数据经指导老师签字，整理好实验设备后方可离开。

### **注意事项：**

1. 本实验预习 5 分，实验操作 42 分，出门测 3 分。
2. 组内编号前二分之一的同学，第一次课做“显微镜的使用”，第二次课做“衍射实验”。组内编号后二分之一的同学，第一次课做“衍射实验”，第二次课做“显微镜的使用”。

# 光学显微镜

光学显微镜（英文 Optical Microscope，简写 OM）是利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，以供人们提取微细结构信息的光学仪器。最早的光学显微镜是 16 世纪末期在荷兰制造出来的，发明者是亚斯·詹森，荷兰眼镜商，或者另一位荷兰科学家汉斯·利珀希，他们用两片透镜制作了简易的显微镜。随后，意大利科学家伽利略通过显微镜观察昆虫，第一次对它的复眼进行了描述。荷兰商人列文虎克自己磨制了透镜，第一次描述了许多肉眼看不见的微小植物和动物，对微生物学做出了巨大的贡献。1931 年，恩斯特·鲁斯卡通过研制电子显微镜，使生物学发生了一场革命。这使得科学家能观察到像百万分之一毫米那样小的物体。1986 年他被授予诺贝尔奖。

显微镜把一个全新的世界展现在人类的视野里，使人类摆脱了肉眼的局限，能够“看”到数以百计的微小动物和植物，以及从人体到植物纤维等各种物体的微观结构。现在的光学显微镜可把物体放大 1600 倍，分辨的最小极限达波长的  $1/2$ ，是人类探索未知世界，进行科学研究的重要工具。

## 实验目的

1. 了解光学显微镜的结构和工作原理；
2. 掌握光学显微镜的使用方法，能够使用显微镜对物体进行观察和测量。

## 实验原理

1. 显微镜的结构
  - (1) 观察体：观察标本。
  - (2) 机架：仪器的主体。
  - (3) 转换器：选择所需物镜（响声定位）。
  - (4) 物镜：对标本进行一级放大。
  - (5) 切片夹：固定切片。
  - (6) 载物台：放置标本。
  - (7) 聚光镜升降手轮：调节聚光镜的高度。
  - (8) 电源插头：连接外部电源。

(9) 微调手轮：微量调焦。

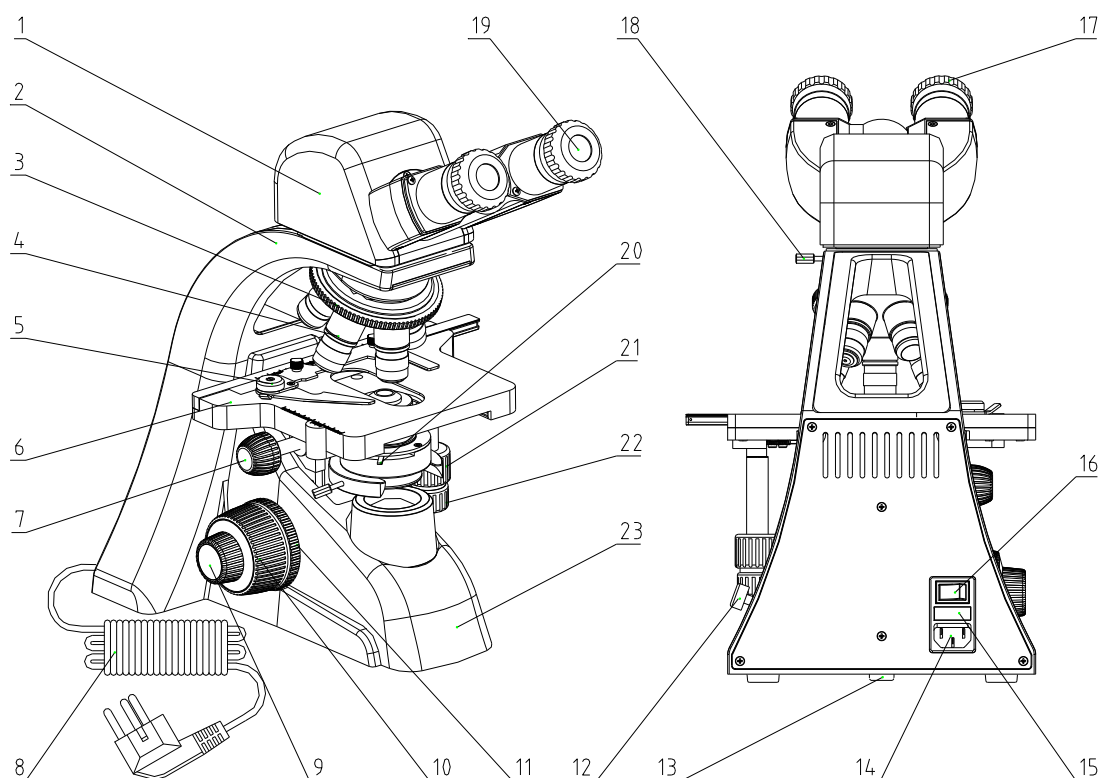


图 1 显微镜结构

- (10) 粗调手轮：对标本进行调焦。
- (11) 松紧调节圈：调节粗调手轮手感轻重。
- (12) 调光旋钮：调整光源亮度。
- (13) 光源罩锁紧螺钉：固定光源罩。
- (14) 电源插座：连接提供照明的电源。
- (15) 保险丝盒：固定可更换保险丝。
- (16) 电源开关：仪器的电源总开关。
- (17) 视度调节圈：调节视度大小。
- (18) 固定螺钉：固定观察体。
- (19) 可调视度目镜：对标本进行二级放大，进行观察。
- (20) 聚光镜光阑拨杆：调节聚光镜光阑孔大小。
- (21) Y 向移动手轮：调节载物台纵向移动。

(22) X 向移动手轮：调节载物台横向移动。

(23) 光源罩：用于更换灯泡。

## 2. 显微镜的工作原理

表面为曲面的玻璃或其他透明材料制成的光学透镜可以使物体放大成像，光学显微镜就是利用这一原理，把人眼不能分辨的微小物体放大到人眼足以观察的尺寸。

近代的光学显微镜通常采用两级放大，分别由物镜和目镜（均为会聚透镜）完成，光路图如图 2 所示。被观察物体位于物镜的前方，被物镜作第一级放大后成一倒立的实像  $A_1B_1$ ， $A_1B_1$  位于目镜的物方焦距的内侧，经目镜作第二级放大，成一虚像  $A_2B_2$  于明视距离处。显微镜的总放大倍率等于物镜放大倍率和目镜放大倍率的乘积。

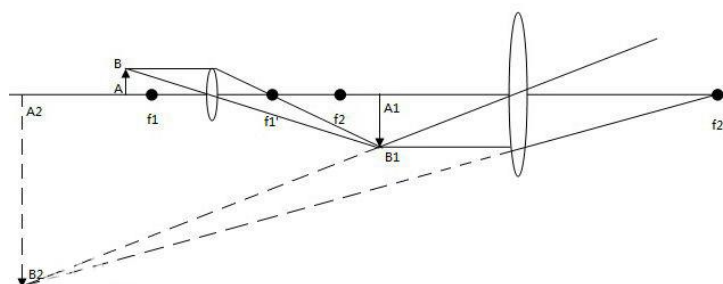


图 2 显微镜放大原理光路图

### 2.1 物镜

物镜安装在物镜转换器上，接近被观察的物体，故叫做物镜或接物镜。物镜的作用是将标本作第一次放大，是决定显微镜性能的最重要部件。物镜根据使用条件的不同可分为干燥物镜和浸液物镜；其中浸液物镜又可分为水浸物镜和油浸物镜。根据放大倍数的不同可分为低倍物镜（10 倍以下）、中倍物镜（20 倍左右）高倍物镜（40 倍以上）。

物镜主要参数包括：放大倍数、数值孔径和工作距离。

①放大倍数指长度尺寸的放大比，而非面积比，物镜的放大倍数与其长度成正比，放大倍数越大，物镜越长。

②数值孔径简写为 NA，与显微镜的分辨力成正比。

分辨力也叫分辨率或分辨本领，其大小用分辨距离（所能分辨开的两个物点间的最小距离）的数值来表示，分辨距离越小，即表示它的分辨力越高，也就是

表示它的性能越好。在明视距离（25cm）之处，正常人眼所能看清相距 0.073mm 的两个物点，这个 0.073mm 的数值，即为正常人眼的分辨距离。显微镜分辨力的大小由物镜的分辨力来决定的，而物镜的分辨力又是由它的数值孔径和照明光线的波长决定的。当用普通的中央照明法（使光线均匀地透过标本的明视照明法）时，显微镜的分辨距离为  $d = 0.61\lambda / NA$ 。干燥物镜的数值孔径为 0.05-0.95，油浸物镜的数值孔径为 1.25。一般地，用可见光照明的显微镜分辨力的极限是 0.2μm。

③工作距离是指当所观察的标本最清楚时物镜的前端透镜下面到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关，物镜的焦距越长，放大倍数越低，其工作距离越长。

## 2.2 目镜

目镜安装在镜筒的上端，接近观察者的眼睛，故叫做目镜或接目镜。目镜的作用是将已被物镜放大的、分辨清晰的实像进一步放大，达到人眼能容易分辨清楚的程度。常用目镜的放大倍数为 5-16 倍。

显微镜的目镜为直插式，其放大倍数与长度成反比，即目镜越长，放大倍数越小。

## 2.3 目镜与物镜的关系

物镜已经分辨清楚的细微结构，假如两个物点的像的距离小于人眼所能分辨的大小，那人眼就无法看清；而物镜所不能分辨的细微结构，虽然经过高倍目镜的再放大，也还是看不清楚，所以目镜只能起放大作用，不会提高显微镜的分辨率。目镜和物镜即相互联系，又彼此制约。

# 实验仪器

显微镜，CCD，标尺，衍射元件，光纤样品，孢子样品，生物标本，载玻片等。

显微镜使用方法：

### 1. 打开照明

打开电源开关（16）（将开关拨至“-”处），使灯泡发亮。旋转调光旋钮（12），调节视场亮度。

### 2. 视度圈复位

转动目镜筒上的视度调节圈，使目镜转到最底部。

### 3. 调节瞳距

调整瞳距，消除视差。当通过两个目镜观察，视场是两个交叉的圆形时，通过转动左右镜体，改变目镜筒的出瞳距离，使镜筒间距与使用者的瞳距一致，视场为一个完全重合的圆形视场，观察更加舒适、清晰。（见图 3）

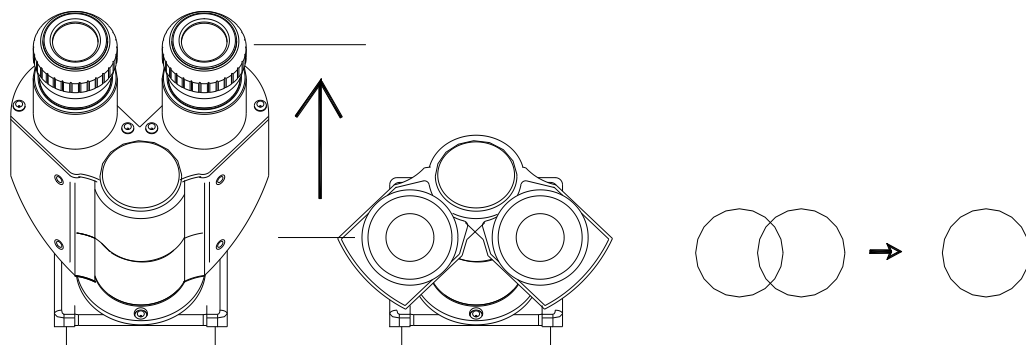


图 3 调节瞳距

#### 4. 放置待观察样品（图 4）

4.1 用手指轻轻打开切片夹（5），将样品（通常制作在载玻片上）放入（如样品上覆盖有盖玻片，盖玻片向上），放开手指，将样品固定。

4.2 调节载物台移动手轮（21、22），使被观察区域位于物镜正下方，以便于观察调整。

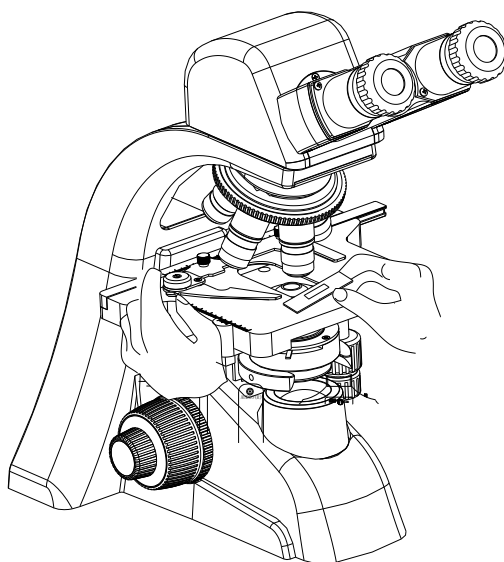


图 4 放置待观察样品

#### 5. 用物镜对焦

★ 对样品进行观察时，首先使用低倍物镜，调焦，然后根据需要逐步更换为高倍物镜。

5.1 旋转物镜转换器（3），将 4×（或 10×）物镜移入光路（当旋转到位时，物镜会自动卡位）（见图 5）。注意：不能用手扳着物镜转动，以免光轴歪斜。

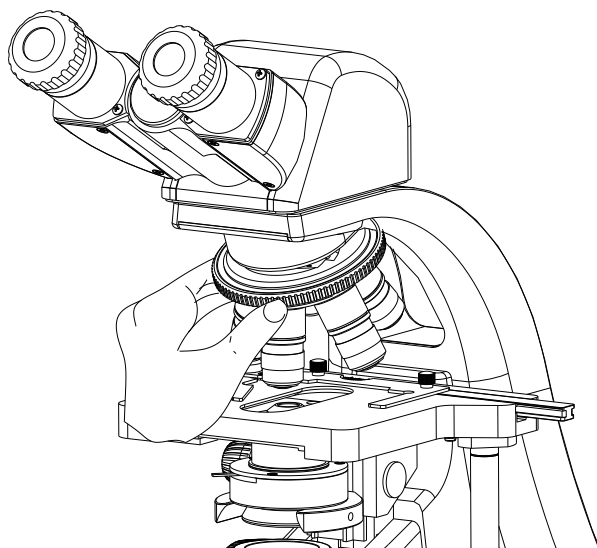


图 5 旋转物镜转换器

5.2 旋转粗调手轮（10），将载物台（6）移动至最高点（见图 6）。当使用粗调手轮升高载物台时，注意样品上表面和物镜下端面之间的距离。当载物台已经到达移动的极限位置后，不要继续旋转粗调手轮，以免损坏调焦结构。

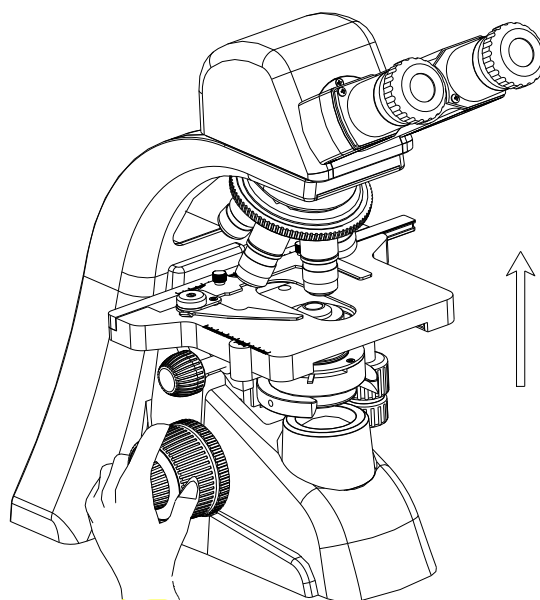


图 6 将载物台向上移动至最高点

5.3 通过目镜（19）进行观察，慢慢旋转粗调手轮（10），降低载物台。当样品像出现时停止旋转（见图 7）。此步骤中旋转粗调手轮进行调焦时，确认旋转



的方向只能是降低载物台的方向。

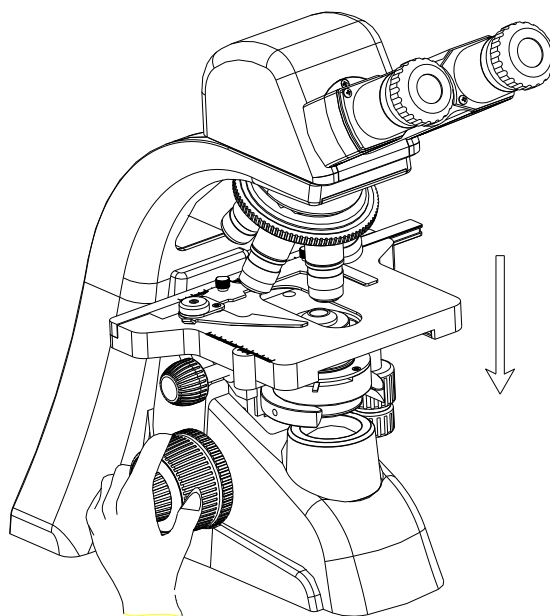


图 7 旋转粗调手轮，降低载物台

6. 旋转微调手轮（9），进行精确聚焦（见图 8）。注意不要同时沿相反方向旋转左右调焦手轮。

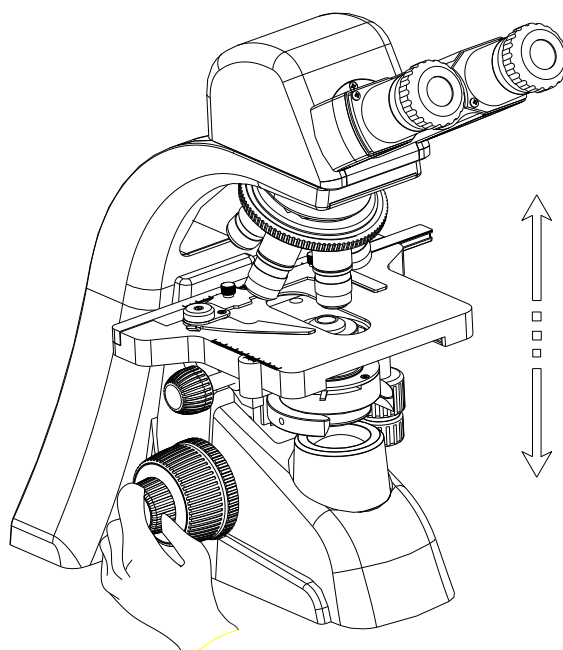


图 8 旋转微调手轮

## 7. 目镜视度调节

如有需要，可根据使用者左右眼的视力差来调节目镜上的视度调节圈（17）。此调节功能可以让使用者充分利用目镜，使双眼观察到的像的清晰度一致（见图

9)。

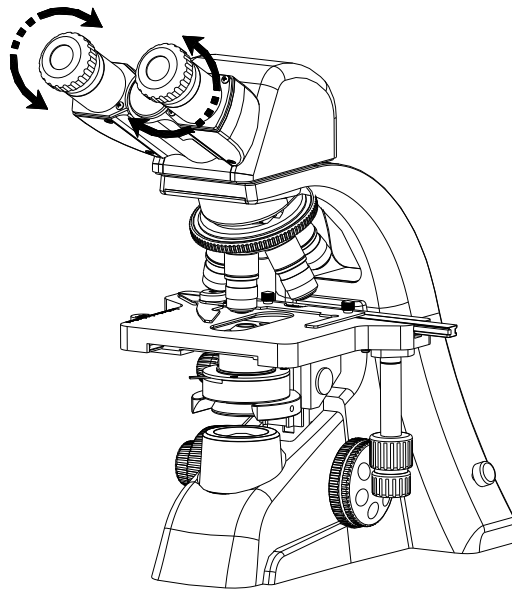


图9 目镜视度调节

8. 如果需要进一步使用高倍物镜观察，应在转换高倍物镜之前，把物像中需要放大观察的部分移至视野中央（将低倍物镜转换成高倍物镜观察时，视野中的物像范围缩小了很多）。低倍物镜和高倍物镜基本齐焦，已用低倍物镜观察清晰时，更换高倍物镜后，只需旋转微调手轮进行精确聚焦。

9. 选择能够清楚观察待测样品的物镜放大倍数，在相应的放大倍数下进行定标（定标方法见附录一）。

10. 对待观测的样品进行拍摄、测量。

11. 转动物镜转换器，将物镜移出光路（如转换器上物镜已装满，则将最低放大倍数物镜移入光路）。旋转粗调手轮，降低载物台。取下样品，放置归位。

12. 显微镜使用完毕后，旋转调光旋钮，调节视场亮度至最暗，然后关掉电源开关。

## 实验内容

### 一、 基础实验

- 1、在物镜不同放大倍数下进行定标；
- 2、测量以下衍射元件的参数：
  - a、单缝的缝宽；
  - b、双缝的中心间距（双缝中心间距 $d=a+b$ ，为光栅常数，即其空间周期， $a$ 为缝宽， $b$ 为不透光部分的宽度）；
  - c、小孔的直径。

### 二、 提升实验

- 1、测量以下样品的长度（或直径）：
  - a、剥去涂覆层的标准单模光纤的直径；
  - b、自己头发的直径；
  - c、孢子的尺寸（长和宽）。
- 2、观察显示 6 种不同颜色时的手机屏幕，拍摄图片并描述观察到的现象。


### 三、 进阶实验

选择合适的放大倍数，观察生物标本切片，进一步熟悉显微镜的使用，拍摄图片并描述。

### 四、 高阶实验

设计、搭建显微镜，给出设计方案和光路图。

## 软件使用注意事项

1. 要求把拍摄的实验内容的图片保存在以自己名字命名的文件夹内，放置在电脑桌面上。其中实验内容一、二的图片中应包含标尺及长度（或直径）信息。
2. 包含标尺及长度的图片，保存图片时首先点击“图层”——“输出至图像”，再保存，位于新图层上的标尺及长度信息才会保存在照片上。不包含标尺及长度的图片，直接保存即可。
3. 如要删除错误的标尺或长度，点击“”，选中要删除的内容，Delete 即可。
4. 定标完成后，如关闭软件再重新打开，需要重新将分辨率设为最大分辨率“2592×1944”，选择实际尺寸“100%”大小浏览视频。此后测量的长度才是基于之前定标操作的长度。
5. 观察手机屏幕时如发现软件显示颜色失真，或亮度太暗，可在左侧“曝光与增益”“白平衡”“颜色调整”内进行调整。

## 实验注意事项

1. 不要用手触及光学元件（物镜、目镜镜头）的表面，避免污损。
2. 对样品进行观察时，首先使用低倍物镜，然后根据需要逐步更换为高倍物镜。
3. 切换物镜镜头时应旋转转换器，不能用手扳着物镜转动！
4. 升高载物台时，注意样品上表面和物镜下端面之间的距离，避免碰撞镜头。
5. 载物台到达移动的极限位置后，不要继续旋转粗调手轮，以免损坏调焦结构。
6. 不要同时沿相反方向旋转左右调焦手轮。

## 附录一：显微镜的定标和测量

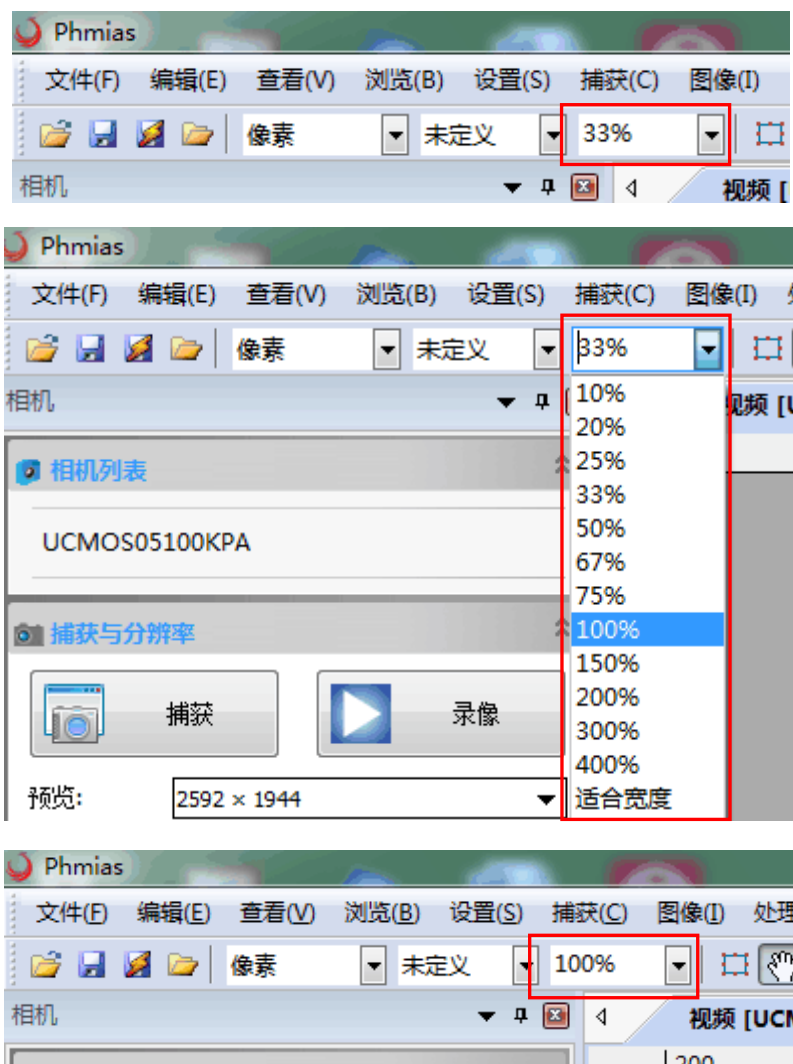
准备工作：

取出标尺，置于显微镜下目视观察，按照显微镜使用说明书调整至清晰；将摄像头连接电脑，选择所需要的物镜倍数。

1. 双击图标打开软件

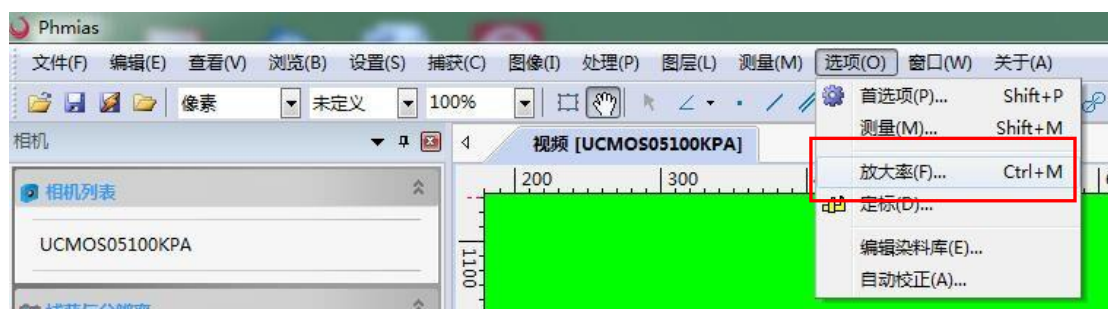


2. 在“相机列表”里点击选中“YW500”，在视频浏览界面进行各个物镜倍数下的标定。
3. 将分辨率设为最大分辨率“2592×1944”，选择实际尺寸“100%”大小浏览视频。



4. 清除已存在的不信任的定标尺寸（如果未设定过请忽略该步骤）。

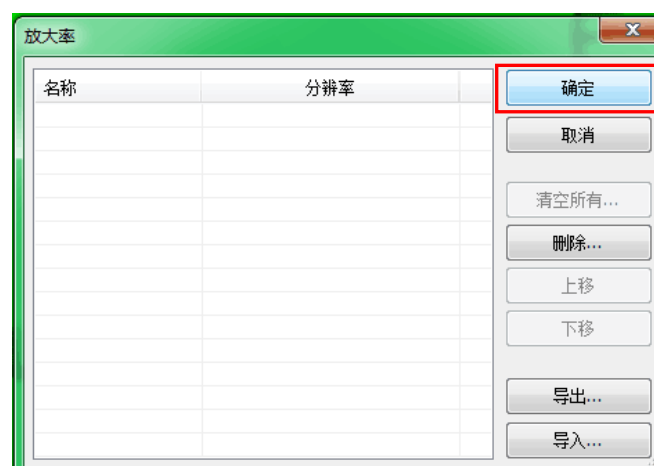
#### 4.1 选择“选项”下的“放大率”



#### 4.2 选择要清除的定标，点击“清空所有”或“删除”

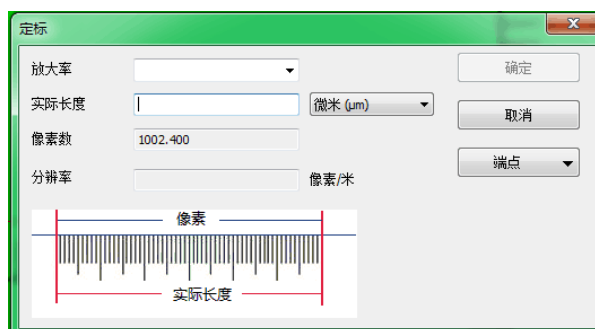
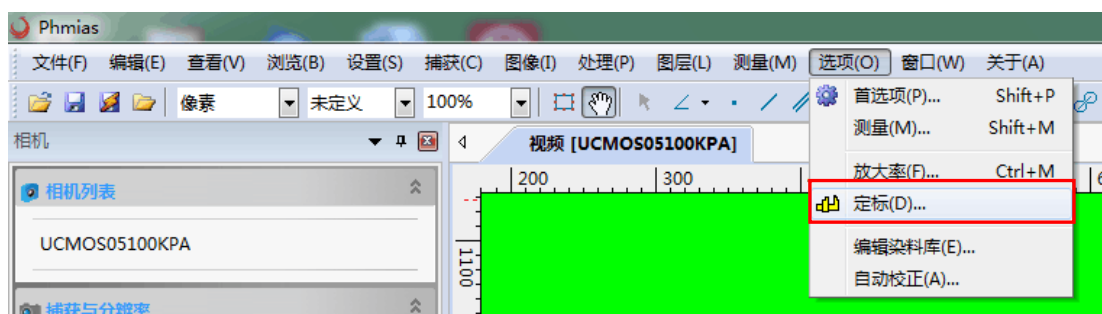


#### 4.3 点击“是”删除所有不信任的定标，若已经存储的定标是信任的则可以直接使用。

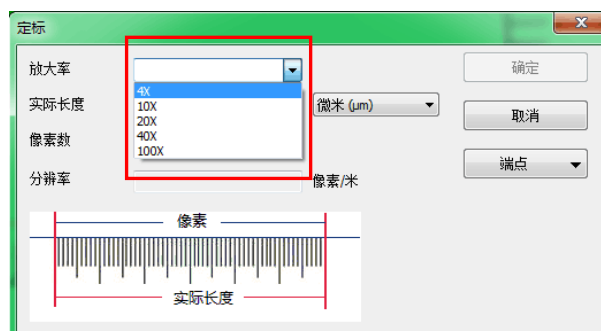


### 5. 定标尺寸

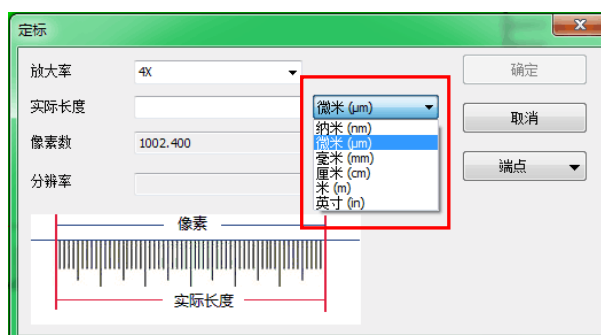
#### 5.1 选择“选项”下的“定标”，弹出“定标”对话框



5.2 选择需定标的物镜倍率（本说明使用 4×物镜，先将 4×物镜移入光路，在“放大率”一栏选择 4×）

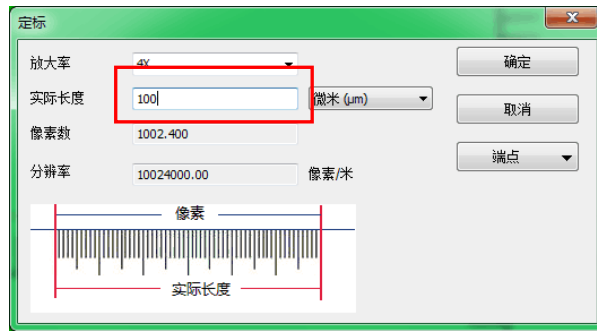


5.3 在实际长度一栏选择单位“微米”

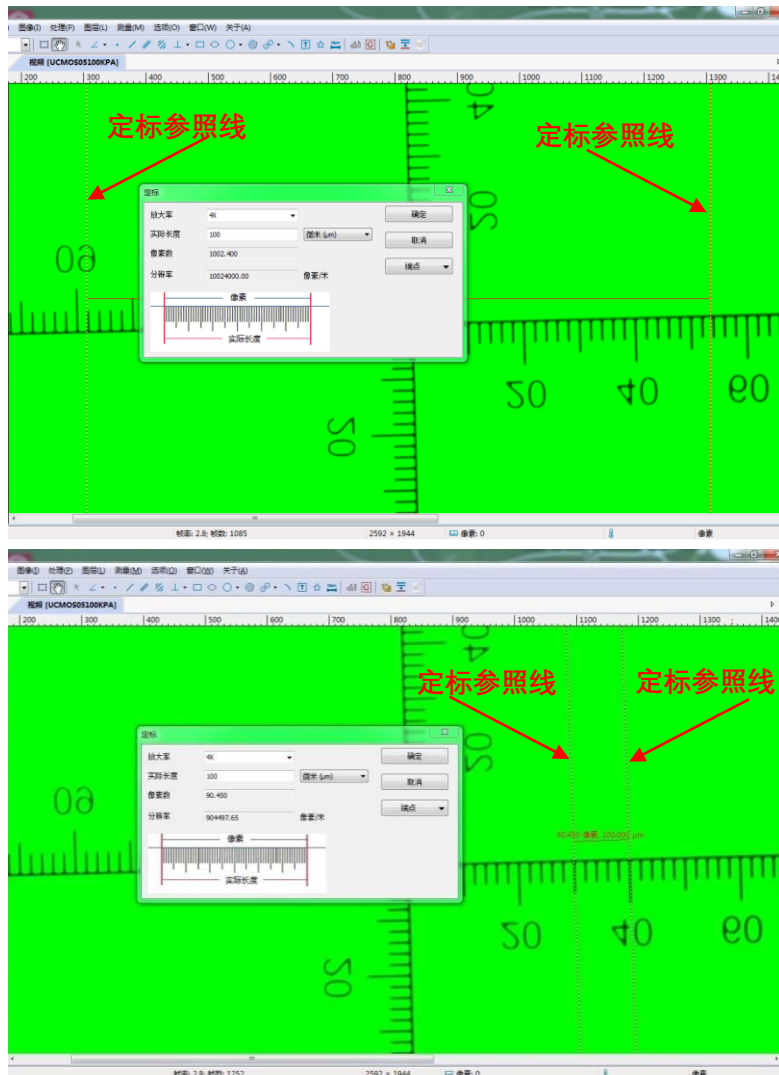


5.4 根据标尺输入实际的定标尺寸

实际长度建议选择整数如 100，200 等，以便对应最小格的数量。

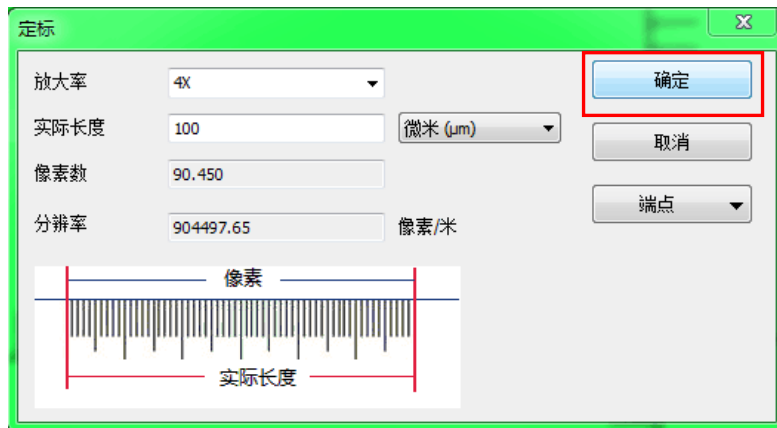


### 5.5 移动定标参照线，选定与实际长度相匹配的格值进行定标



### 5.6 点击“确定”，完成定标

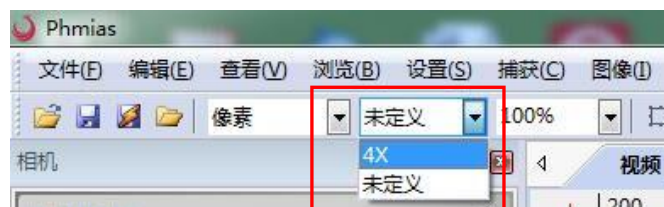




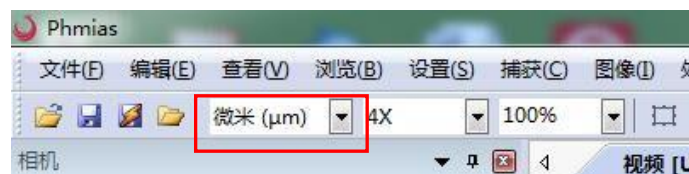
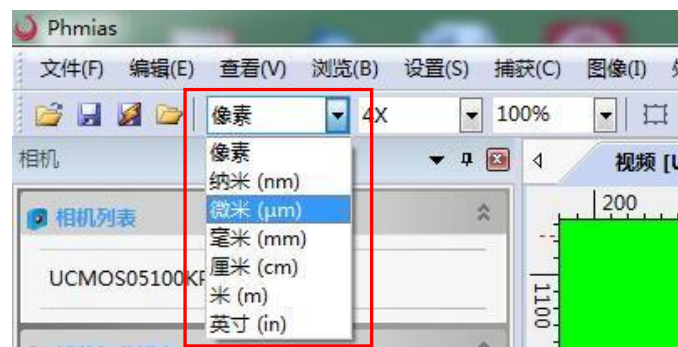
5.7 如 5.5 所示，将所有倍率的物镜依次进行定标

## 6. 测量

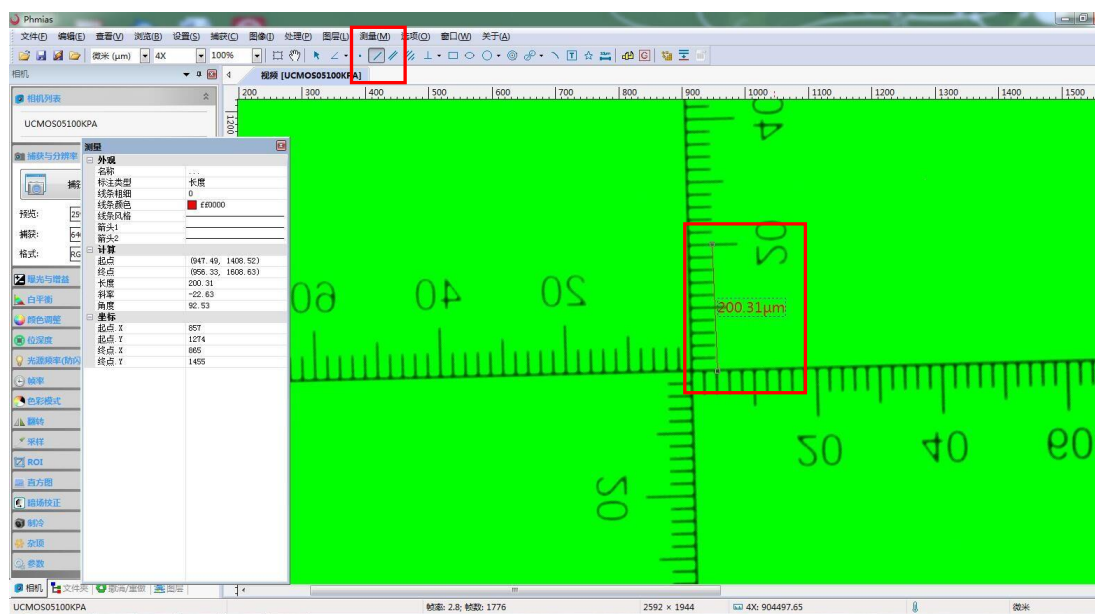
6.1 在软件上定义与观测物镜相匹配的倍率



6.2 选择定标尺寸时所用的长度单位



6.3 选择所需的相应工具进行测量。



## 附录二：显微镜规格

数字观察体	铰链双目	观察角度 30°	瞳间距: 55~75mm
目镜	广角目镜	广角 WF10×	目镜接口: 30 mm 齐焦距离: 10 mm
物镜	放大倍率	数值孔径	齐焦距离
	100×油	1.25	45 mm
	40×	0.65	45 mm
	10×	0.25	45 mm
	4×	0.1	45 mm