

明视显微术中若干值得重视的问题

章潜才

(实验中心)

摘要 本文以获取高质量显微照片为目的,就明视显微术中的库勒照明、反差、彩色还原以及屈光度调整等问题进行讨论,以期引起生物学研究者的重视,并从中获取裨益。

关键词 明视;库勒照明;反差;彩色还原

电子显微镜的出现,对生物学方面的研究无疑是一项重大的推动,但它未能取代光学显微镜。现代科学技术的发展,使光学显微镜无论在性能、功用、操作和高效等方面都获得很大的发展。国际上各大生产光学显微镜的公司(如蔡斯、奥林巴斯、AO公司)互相竞争,在仪器构造、性能等方面不断引进现代新技术,推陈出新。现代的光学显微镜在表现分辨率、反差、彩色还原诸因素中绝大部分都是优秀的,关键的问题是操作者在着手进行分析研究以及摄影前,忽视或违背了各种显微镜操作特性和程序,以至未能获得预期效果。

综合前人经验,结合实践,就明视显微术中若干重要问题进行分析。文中提及的显微镜以奥林巴斯 BHS 研究用显微镜为例。

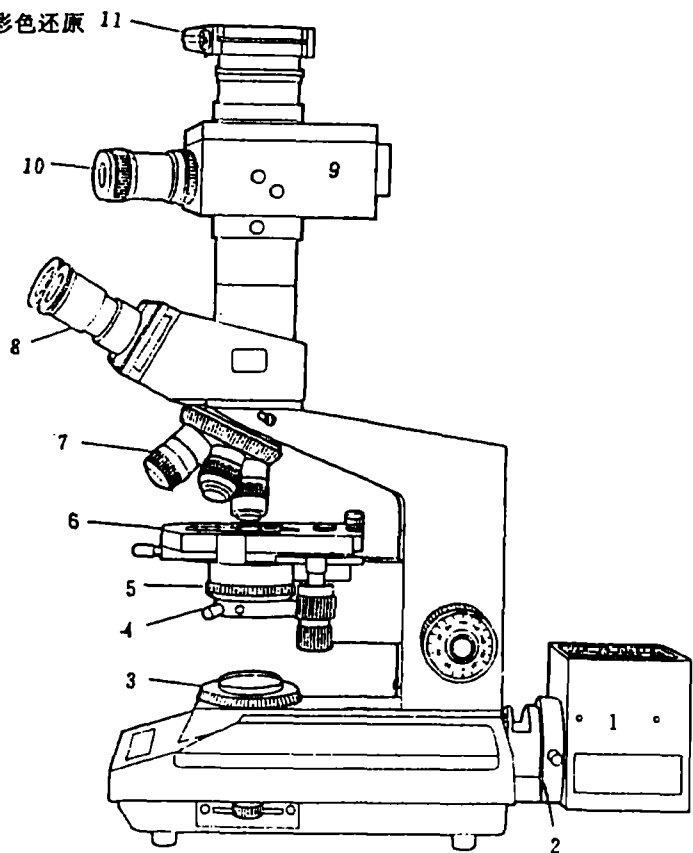


图1 研究用显微镜示意图

1、灯室 2、集光器 3、场光栏 4、聚光镜孔径光栏 5、聚光器 6、载物台 7、物镜 8、目镜 9、摄影装置 10、取景望远镜 11、照相暗匣

1990-05-03 收稿

1 问题和方法

1.1 明视显微术中的库勒 (köhler) 照明法^[1]

通过目镜进行观察，样品或所观察的对象是暗的或彩色的，而背景却是明亮的或是近乎白色的，这类光学显微术即为明视显微术，亦称明场显微术。

早期的显微镜多采用自然光作光源，由于它来自无限远的地方，因此我们视之为平行光束，在实际应用中，只要将它集中反射到样品上（载片上）便行了，没有更多要注意的问题。

然而，现代光学显微镜，绝大部分采用人工光（如环状钨丝灯，钨弧或氙弧灯），它们都是不均匀的光源。为使样品得以均匀照明而不影响图像的质量和分辨率，显微镜设计者在照明系统中设置了灯——集光器——场光阑——孔径光阑——聚光器等装置（图1）。

这种照明系统是根据库勒照明原理设计的。有些研究者往往忽视库勒照明的重要步骤，采用临界照明术，或者根本就没有考虑什么照明方法，仅仅是有光线通过使视野得到“照明”而已。结果是照明光束与灯丝像同时存在于样品上，影响了观察对像的均匀照明和图像的分辨率。

正确的照明是采用库勒照明法。它利用场或灯集光器（或称灯聚光器）将灯丝的像成焦于台下聚光器的后焦面上，而将灯聚光器的像（即照明光束）成焦于样本平面上，因而实际上灯聚光器成了照明光源（图3）。

在明视显微术中，库勒照明是一种理想照明系统，它既用于一般的目视观察，又用于显微摄影术中。在相

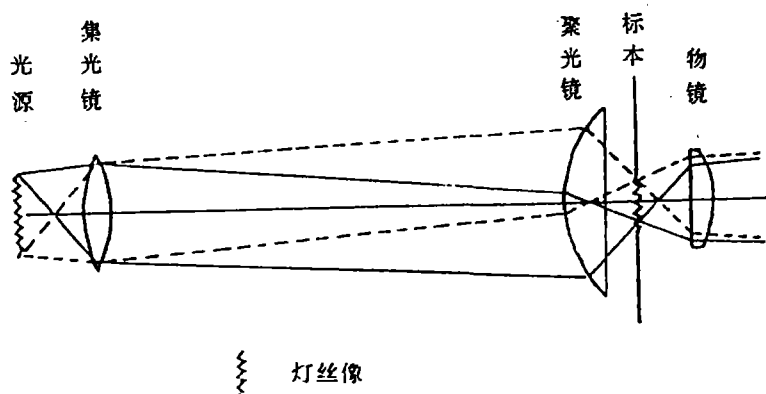


图2 临界照明示意图

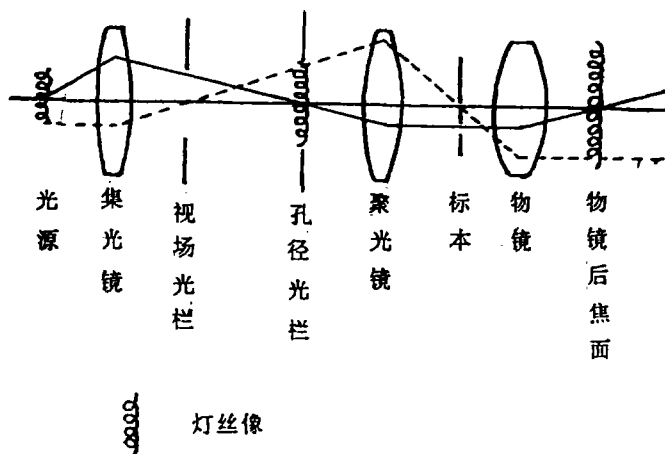


图3 库勒照明示意图

差显微术中和微分干涉显微术中同样适用。因为它提供了最好的图像质量和最高的分辨本领。

库勒照明步骤如下:

(1) 接通显微镜电源, 使灯亮; (2) 选一标本载片置于载物台; (3) 置 10 倍物镜进入光路; (4) 通过目镜观察, 使样本聚焦;

(5) 缩小孔径光栏

和场光栏, 在视野中看到光栏图像

(图 4); (6) 调节聚

光器高度旋钮, 使光栏图像聚焦 (清晰可辨); (7) 如光

栏图像不对中, 用

光栏对中旋钮 (位于聚光器上) 进行

调整校正; (8) 扩

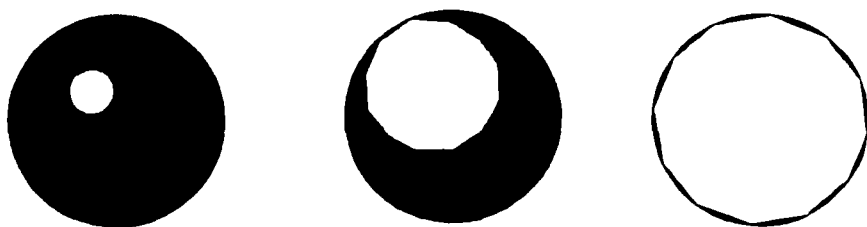


图 4 场光栏调整对中示意图

大场光栏, 使光栏图像在视野中刚刚消失为止。

1.2 黑白片提高反差的问题

在科学书籍、期刊或报告中的图片大都采用黑白图片。因此, 良好的图像反差便是每一个显微研究者的最基本的追求目标。

一般地说, 着色标本的染色好坏是影响反差的最基本条件, 而在显微摄影术中有几个影响反差的因素值得重视。

1.2.1 反差滤色镜 反差滤色镜对于提高黑白图像的反差是重要的方法之一。在明视场的观察中, 绝大部分的标本都是经过染色的, 为了使拍摄的标本突出于背景或使出现在黑白片上亮度相等的不同颜色成分得以分化, 则希望增强反差。在后一种情况下, 便可利用某一滤光镜使吸收一种较多的颜色, 而使另一颜色的光通过, 否则, 所记录的颜色在利用全色片摄影时, 便会出现相类似的灰色调, 难于分辨。当标本的颜色十分苍白而背景却极为明亮情况下, 摄下的样本将是在白色背景上有一浅灰的目的物。如果用一滤光镜吸去标本的颜色, 就可以显出深灰色而达到增强反差的效果。

在一般情况下, 黄、绿色滤光镜最常用。这是因为: (1) 不管物镜对像差的校正程度 (消色差或复消色差) 如何, 最起码是对黄、绿色光波的校正是最完美的, 而邻近于黄、绿色光波的其他光波却不一定得到好的补偿^[3]。加用黄、绿色滤光镜, 则能满足物镜的这一要求, 使拍摄出来的照片清晰度大大提高 (图 1, 2)。(2) 在组织切片的染色中, 苏木精素和曙红染料是最常用的。用这两种色素所染的组织片的颜色, 对绿色光的吸收比较好, 加用绿色滤光镜后, 所拍的照片便能得到较好的反差。

在实践中, 选用滤光镜的方法是通过显微镜, 在光束中试用不同的滤光镜来检验标本, 在取得所期望的反差和细节表现时, 此滤光镜便被选定。

如果希望在一个染色标本与背景之间得到最大反差, 则滤光镜应当完全吸收标本的颜色, 在这种情况下, 滤光镜的颜色应当是标本颜色的互补色。表 1 正是根据这一原则而制定。

表1 黑白摄影中反差滤色镜的选择

提 高 反 差		降 低 反 差
标本颜色	滤光镜颜色	使用与标本颜色相同的滤光镜
蓝、蓝绿、绿	红	
红、紫红、品红	绿	
褐、黄	蓝	
紫	黄	
一般情况	绿或黄	

1.2.2 孔径光栏 孔径光栏位于聚光器下,是可调的。其目的是控制进入聚光器光束直径,因而控制进入物镜的光锥角度,以便充分利用整个孔径($N \cdot A$)。

孔径光栏正确置定与否,既影响图像的反差,也影响图像的质量(分辨率)。孔径光栏太大,结果是降低了图像的反差,质量低下;孔径光栏太小,则降低了聚光镜和物镜的有效数值孔径,造成分辨不良,同时还会产生明显的干涉条纹出现在标本图像中,造成低劣的图像(图版3,4,5)。

要获取高质量、反差好的标本图像,必须根据物镜的数值孔径($N \cdot A$)值来选定聚光器的数值孔径。一般的经验认为:

聚光器孔径光栏置定值 = 物镜数值孔径 $\times$ 0.6~0.8。例如:40倍物镜数值孔径值为0.65,按上式则聚光器数值孔径光栏应置定在0.40~0.45之间为宜。

在实际操作中也可用下述方法进行调节:

(1)使标本正确聚焦后,取下左目镜;(2)观察镜筒,边观察物镜的后焦平面,边用手调节聚光器孔径光栏,大小如图5所示。

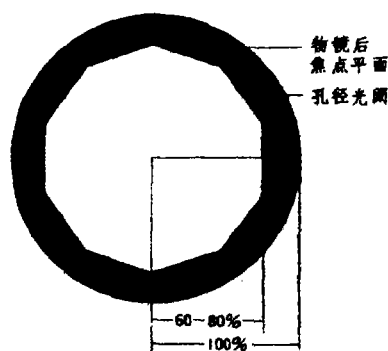


图5 聚光孔径光栏调节示意图

1.2.3 黑白感光片 黑白显微摄影常常采用负片,反转片很少使用。

负片的选择需要考虑下列因素:对色的敏感性;反差;颗粒大小;分辨本领;速度和曝光以及显影时限等。

黑白感光片可分为具有高、中、低反差3类。对于明视场显微摄影来说,细颗粒、高分辨本领、中等反差的全色胶片(卷)多被选为黑白摄影。红颜色的标本不能选用正色片(对红光不敏感)。在现代显微摄影中,除非暗视场摄影或摄影对象是活动的需要高速度感光材料外,胶片(卷)的感光速度不被视为重要的因素。

实践证明,国际上对于显微摄影,美国柯达帕纳托米克(kodak Panatomic-x)胶片和日本富士全色胶片F(Fuji Nenpan F)最为显微摄影家所接受^[4]。中国生产的黑白胶卷(135 100ASA)有“太行牌”、“公元牌”、“无锡牌”、“友谊牌”、“上海牌”、“吉林牌”、“青岛牌”、“厦门牌”等20多种,北京大学生物系根据实践认为“太行牌”用于黑白显微摄影具有一定的水平,作者认为“公元牌”、“上海牌”黑白胶卷均可用于显微摄影。

1.3 彩色显微摄影中的彩色重现问题

利用显微镜作彩色摄影时,最使人烦恼的问题便是照片上的颜色与实际观察到颜色有差别,有时照片偏蓝,有时照片偏红(黄),这便是颜色的偏移问题^[9]。不可否认,彩照的冲印技术有很大的影响。对于显微摄影者来说,彩色重现的质量不同,取决于彩色胶片(卷)和光源的组合。

首先应该明了的是,彩色照片依照明的种类分成日光型(Daylight Type)和灯光型(Tungsten Type)2种。日光型胶卷所需的照明色温为5500 K(日光的色温)、灯光型胶卷所需的照明色温为3300 K或3400 K。如果所选的胶卷与所用的光源不符时,则颜色的还原将不能达到,即所记录的图像出现错误的光平衡。

同时还应明了的是,研究用显微镜大多数采用环状卤素钨丝灯作为内装照明系统的光源。这种灯为不同厂商所生产,电压不同,则色温变化也不同,一般为2800 K到3200 K之间。

在正常情况下,如果钨丝灯用作显微摄影的照明源,则应用光平衡为灯光型的彩色胶卷。当光源具日光性(如氙弧灯或电子闪光灯)时,则应采用日光型胶卷。只有这样才能正确记录和复制标本。

但实际的情况是,在国内市场上,很难买到适合于显微摄影用的灯光型彩色胶卷,很多人都采用普通摄影用的日光型胶卷用于显微摄影。因此,为了得到正确的彩色重现,就必须在光源和胶卷之间加入色温平衡滤光片来解决这个色温差的问题。

在高级研究用显微镜中,一般都配备有色温平衡滤光片。在奥林巴斯BHS显微镜中,分别配备有LBD——2N(或LB45)和LBT二种色温平衡滤光片,同时配备一个色温计用于测定色温。LBD——2N是由二块浅蓝色滤光片组合而成(柯达公司则配备有NO:82系列)。它们能有效地提高钨丝灯的光源色温,使之适合于日光型胶卷。LBT是一块浅黄色滤光片(柯达公司配备有NO:81系列),为灯光型彩色胶卷平衡色温之用。它是用于降低光源色温的,在显微摄影中很少使用,因为很少有过高的光源色温出现。

色温平衡滤光片一般置于显微镜基座上的光路出口上,结合利用色温计,调整照明强度便能得到正确的色温平衡。

1.4 照片焦点不正确的问题

有些显微摄影者会遇到照片模糊不清的问题,在目视中摄影目标虽很清楚,但拍下来的照片却模糊不清。笔者认为,有如下几个问题必须明确。

1.4.1 照片上的焦点是与取景目镜的焦点同步的 现代的高级研究用显微镜都配备有专用的照相暗匣,它与摄影控制装置同步使用。由于观察目镜与照相暗匣的机械长度不一致,亦即焦点平面并非处于同一水平上,因此,摄影时,观察目镜上的焦距不等于暗匣中胶片的焦距。胶片上的焦距必须用摄影体上的取景望远镜来确定(图1),否则,照片便不能得到正确的焦点。

1.4.2 取景望远镜的屈光度调整 利用取景望远镜调焦时,必须事先进行屈光度的校正。只有正确地校正了取景望远镜的屈光度,才有可能使不同视力的摄影者都能拍出正确焦点的照片来。有些显微摄影者不作屈光度的调整,直接用微调旋钮进行聚焦调节,这种做法无异于近视者看书,不是配备合适的眼睛,而是将书本向眼前移,结果是破坏了观察者与照相机的同步效应,当然得不到清晰的照片了。

取景望远镜屈光度的校正方法如下：

- (1) 将观察体上的光路选择连杆置于绿色挡，使成像光束通过摄影目镜，成像于取景望远镜中（图像是否清晰不重要）。
- (2) 通过取景望远镜观察双十字丝。
- (3) 调整取景望远镜上的屈光度校正钮，使双十字丝清晰可辨（图6）。如双十字丝不易分辨，可用细调旋钮使欲摄影物过焦（模糊），然后进一步调节双十字丝清晰。
- (4) 用细调钮使欲摄影目的物精确聚焦。
- (5) 拍照。

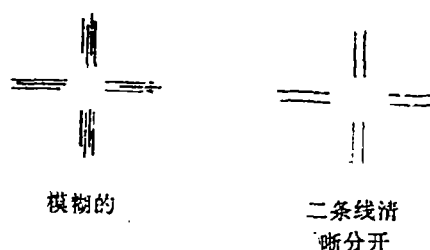


图6 双十字丝调整示意图

一些生产厂家为满足显微摄影者的习惯，也配备一种取景目镜，它直接安装在双筒观察目镜的镜筒上，利用这种装置取景摄影时，同样地需要校正该取景目镜的屈光度，否则，底片上的焦点不能正确达到。

2 结 论

要获取高质量的显微照片，需要考虑的因素是多方面的。由于所用的显微镜不同，在注意上述各问题的基础上，特别建议研究者在使用显微镜之前，认真研读一下说明书，这对于自己的研究工作会起“磨刀不误砍柴工”的作用。

参 考 文 献

- 1 柯达公司编著显微摄影术。喻珈译。北京：科学出版社，1981。52~57
- 2 王伯扬著。生物科学摄影基础。北京：高等教育出版社，1980。84~86
- 3 王曙编著。偏光显微镜和显微摄影。北京：地质出版社，1978。41~42
- 4 柯达公司编著。显微摄影术。喻珈译。北京：科学出版社，1981。97~99
- 5 柯达公司编著。显微摄影术。喻珈译。北京：科学出版社，1981。79~91

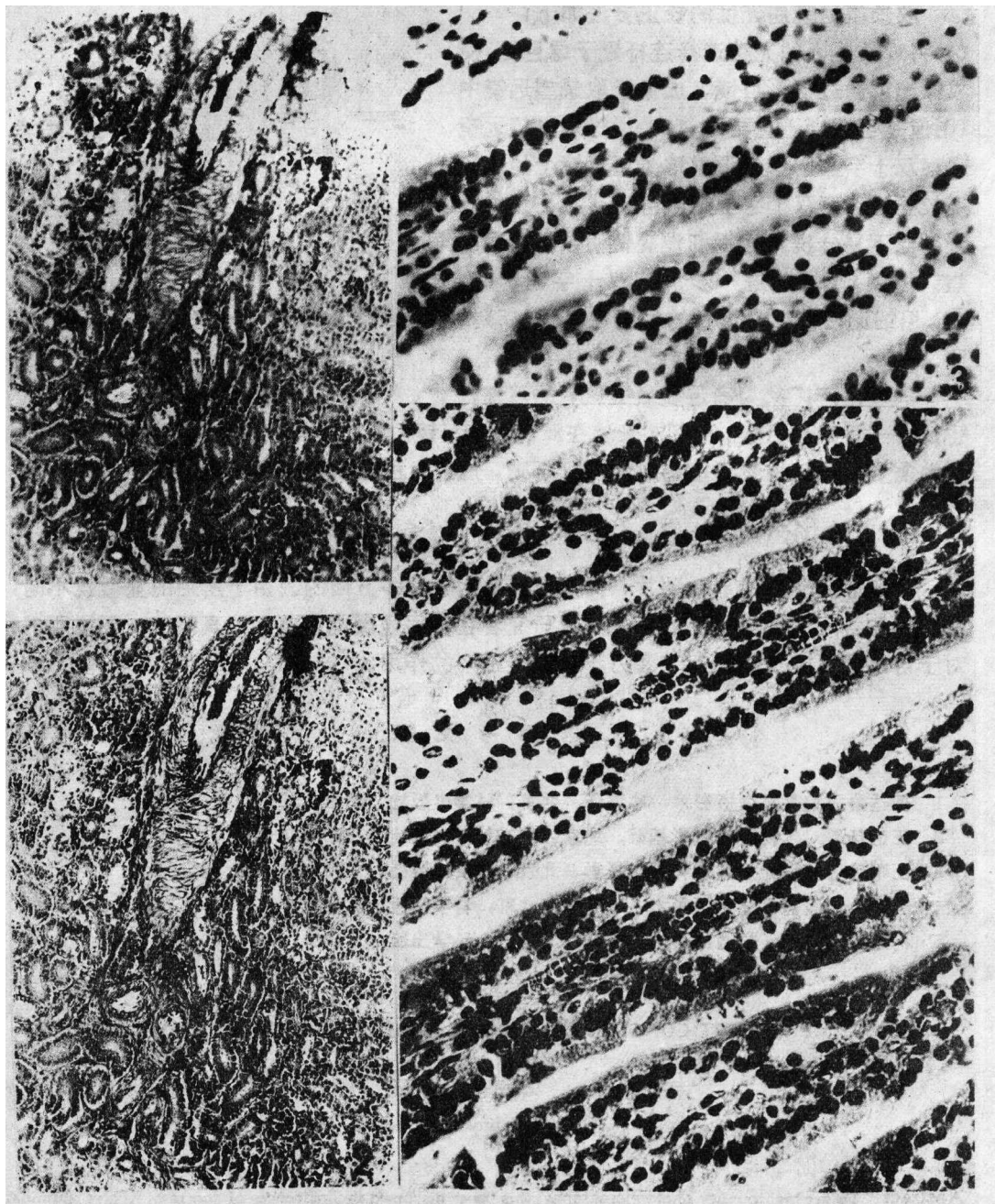
SOME IMPORTANT CONSIDERATIONS IN BRIGHT-FIELD PHOTOMICROSCOPY

Zhang Qiancai

(Experiment Centre)

Abstract To get high quality photomicrographs, this paper discussed the influences of contrast, Köhler illumination, colour-reduction and diopter adjustment on bright-field photomicroscopy. It is hoped that this paper would attract the attention of , and be beneficial to , biological workers.

Key words Köhler illumination; Contrast; Colour-reduction



图版 1 鸡肾组织 未加滤光镜观察摄影 细节显示平淡 $\times 170$; 2 鸡肾组织 加绿色滤光镜观察摄影 细节显示清晰 反差好 $\times 170$; 3 鼠小肠组织 聚光器孔径光栏过大 细节损失不清晰 $\times 170$; 4 鼠小肠组织 聚光器孔径光栏适中 细节显示清晰 反差好 $\times 170$; 5 鼠小肠组织 聚光器孔径光栏过小 反差好但分辨率低 $\times 170$