

# 回顾

- 1. 显微镜的“专业”操作。
- 2. 标准的生物科研绘图。







# 实验二、暗视野显微镜的制作与使用

实验目的：

- (1) 掌握暗视野显微镜的工作原理；
- (2) 了解暗视野显微镜的观察特点；



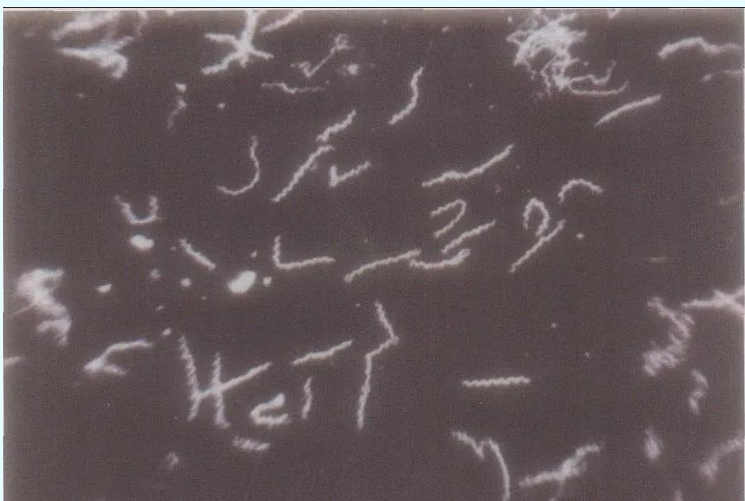
- 
- 
- 只能看到物体的存在和运动, 不能辩清物体的细微结构。
  - 可用以观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等.



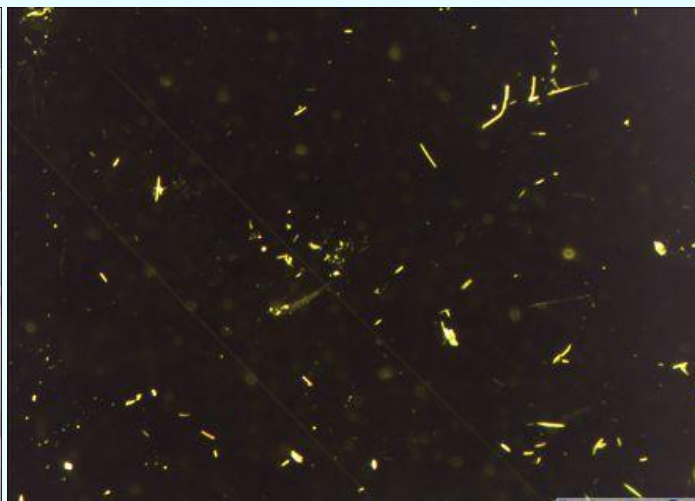
## 暗视野显微镜观察特点（优越性）

- 可分辨 $0.004\mu\text{m}$ 以上微粒的存在和运动，普通光学显微镜最大分辨力为 $0.2\mu\text{m}$ 。
- 胶体化学领域中观察溶质粒子的布朗运动，
- 原虫、细菌的鞭毛、伪足运动，
- 医学检验学范围适用于观察人体体液中螺旋体、尿管形、结晶或各种粒子。
- 无需染色的。





暗视野显微镜下显示梅毒螺旋体



暗视野显微镜检测透明触摸屏表面损伤



《微观帝国》暗视野显微技术（团藻）



图 剑水蚤 ( 4x )  
采用暗场技术  
摄影：沈师某位咖



图 剑水蚤 ( 4x )  
采用暗场技术  
摄影：未知



图 怀孕大型水蚤 ( 4x )  
采用改良暗场、偏振光、图像叠加等技术  
摄影：Marek Miś





# 一、实验原理

光学上的丁达尔原理。

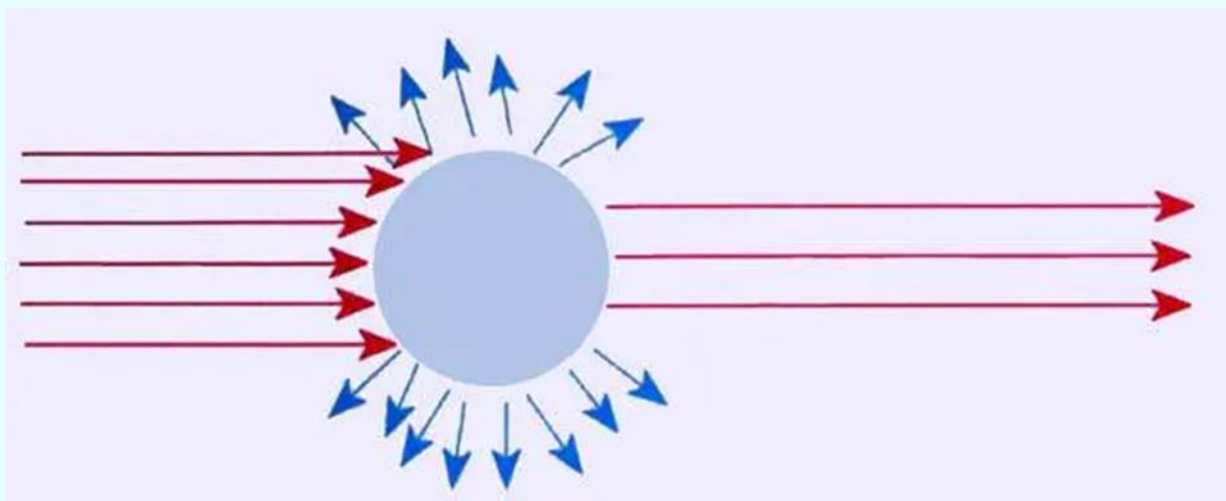
使用遮光板或暗视野聚光器,使光源的**中央光束被阻挡,直射光**不能由下而上地通过标本进入物镜,整个**视野是黑暗的**,由样品发出的**衍射光和反射光**形成了明亮的物体影象。

思考：暗视野成像是否需要光？是什么光？

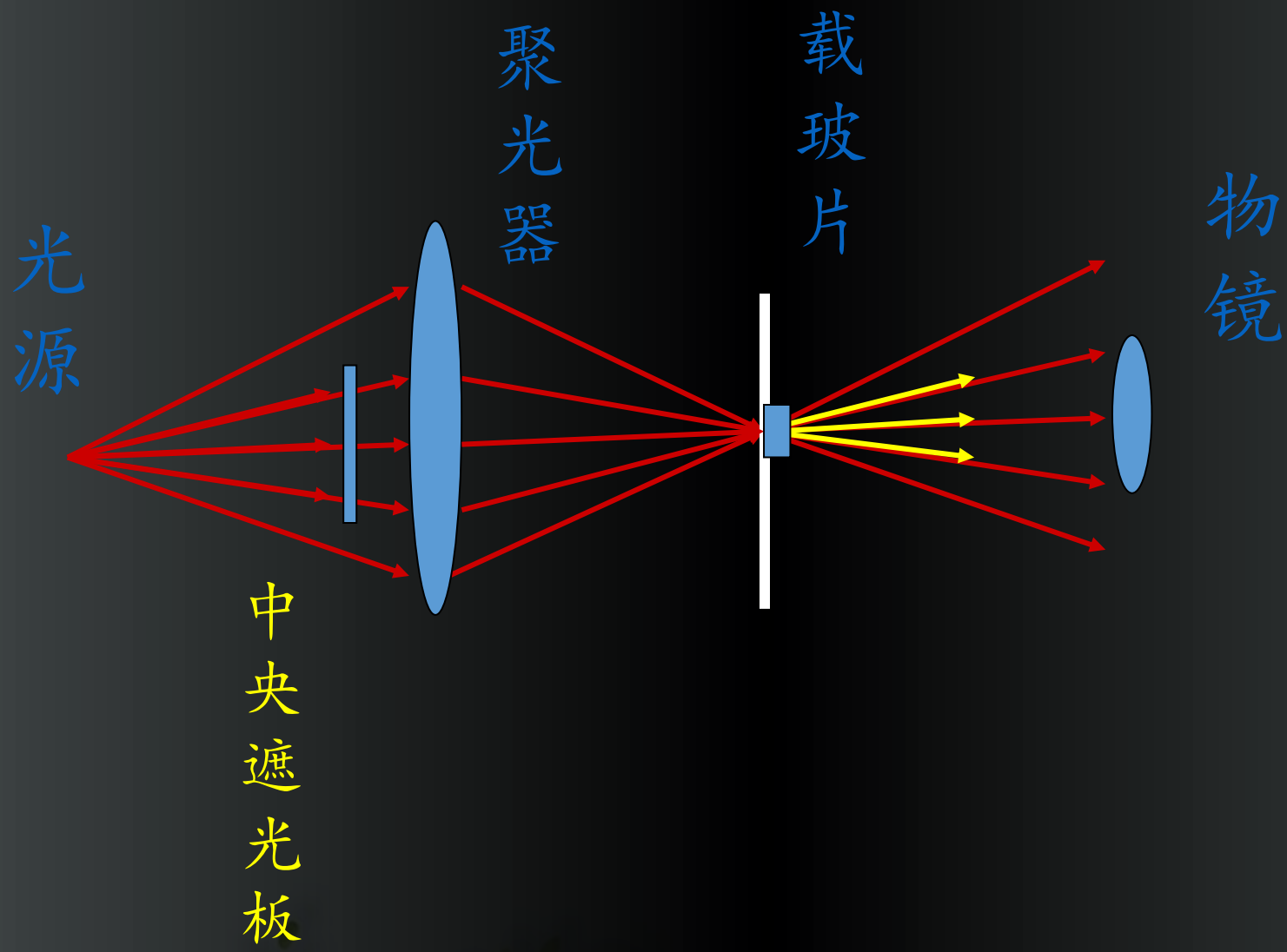
样本发出的光从哪来的？

# 解读：

- 暗视野照明法是斜射照明法的一种。
- 斜射光线绕射或反射，在被检样品表面形成散射的光层，构成标本外形的侧影——衍射光图像。
- 暗视野显微镜下所看到的只是物体的轮廓或物体的运动。







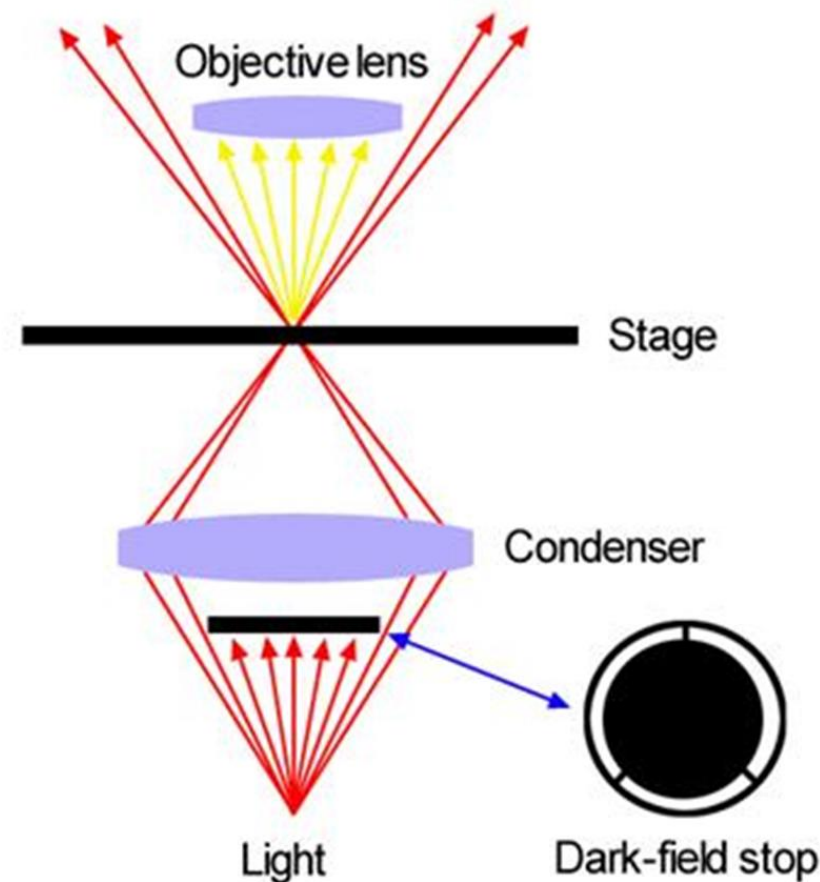
## 二、实验步骤

(1) 将显微镜聚光器调到**最高位置**, 打开**孔径光阑**;

(2) 调节视场光阑的大小, 使其与镜筒中所见物镜的视野相等, 并调焦至边缘清晰.


(3) 适当缩小视场光阑, 并用厚黑纸剪制中央挡光板, 大小与调节好的视场光阑等大。

(4) 将中央挡光板放在**遮光器**中央, 制作样本观察。



# 注意事项

- 样本：活，先黑纸片后抓虫。
- 挡光板：圆，非常圆。
- 建议4倍物镜观察。
- 中央遮光板回收,以便在后面的实验中使用。



**今日操作：** 1. 制作暗视野显微镜，并观察浮游生物

## 作业：

1. 如果黑纸片不圆会出现什么样的观察效果？
2. 对比分析成像区别，文字描述，**提交照片（史诗级的）：**
  - ① 明视场观察活虫子、死虫子；
  - ② 暗视场观察活虫子、死虫子；





# 生物绘图示例

这个圈圈代  
表视野

结构用点构图，  
密集或者疏散的  
点

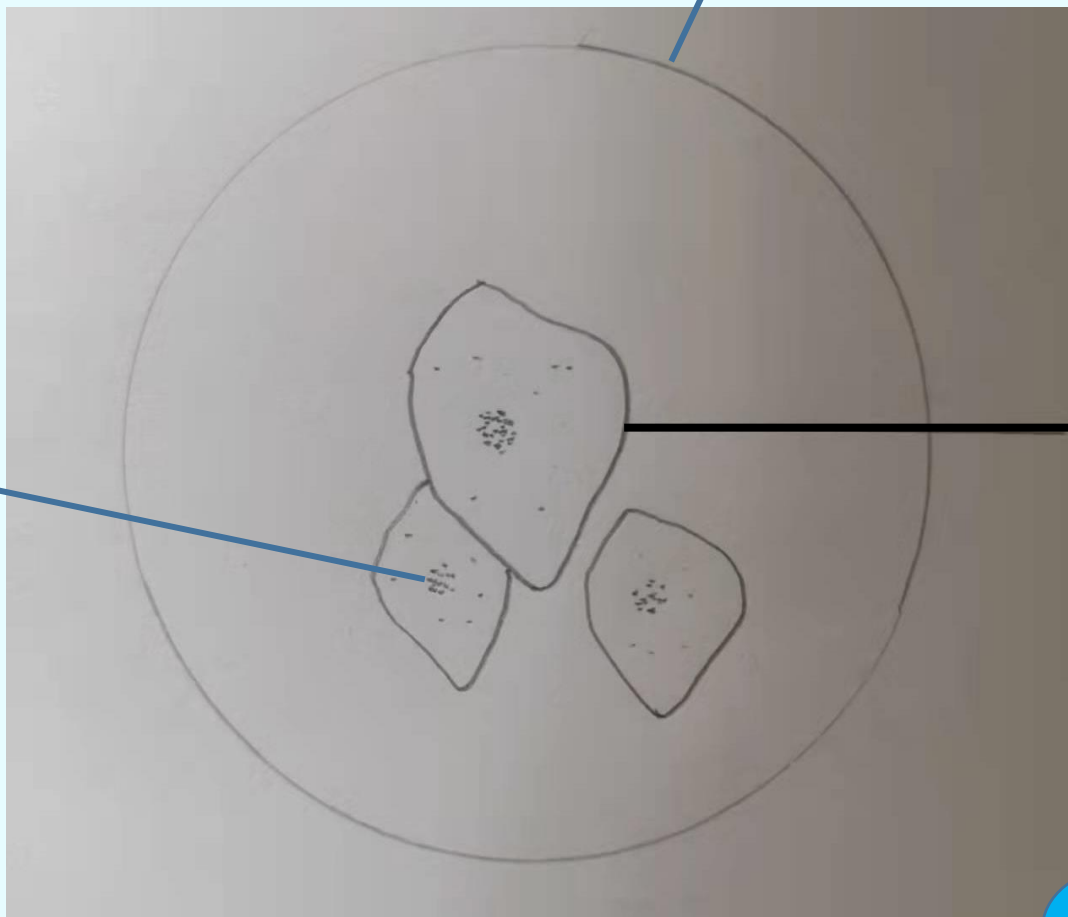
右侧为主，  
指出本图的  
中心人物



人口腔上皮细胞

图题+放大倍数  
与图片是上下  
结构

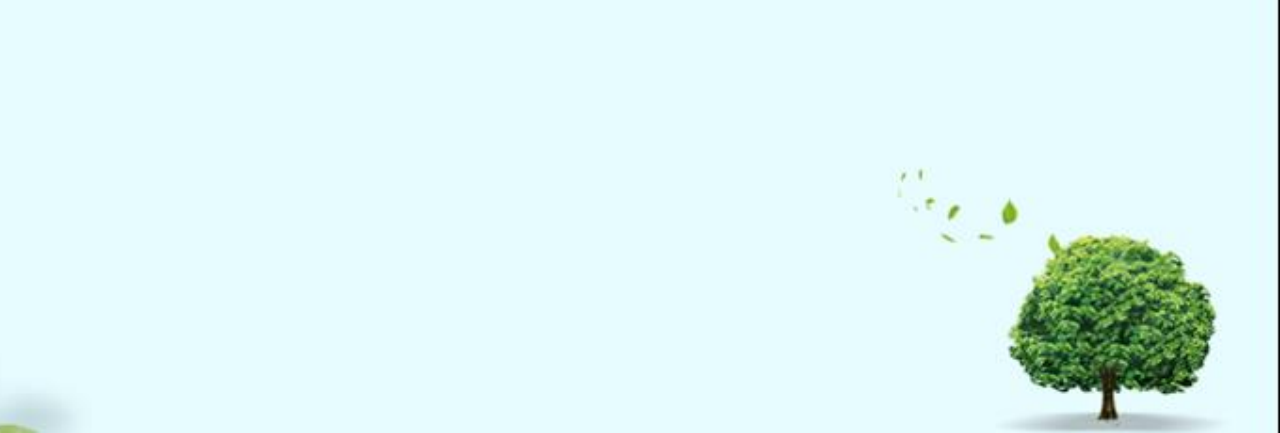

图1 人口腔上皮细胞示意图 ( $10\times 40$ )

图1 人口腔上皮细胞示意图 ( $\times 400$ )





2019年10月21日，尼康仪器公司公布了本年度尼康微观世界显微摄影大赛（NIKON ' S SMALL WORLD）的获奖者。这个赛事已有45年的历史，今年，来自近百个国家的微观摄影师提交了2000多张参赛照片，从这些精彩纷呈的作品中，评委们选出了前20名。



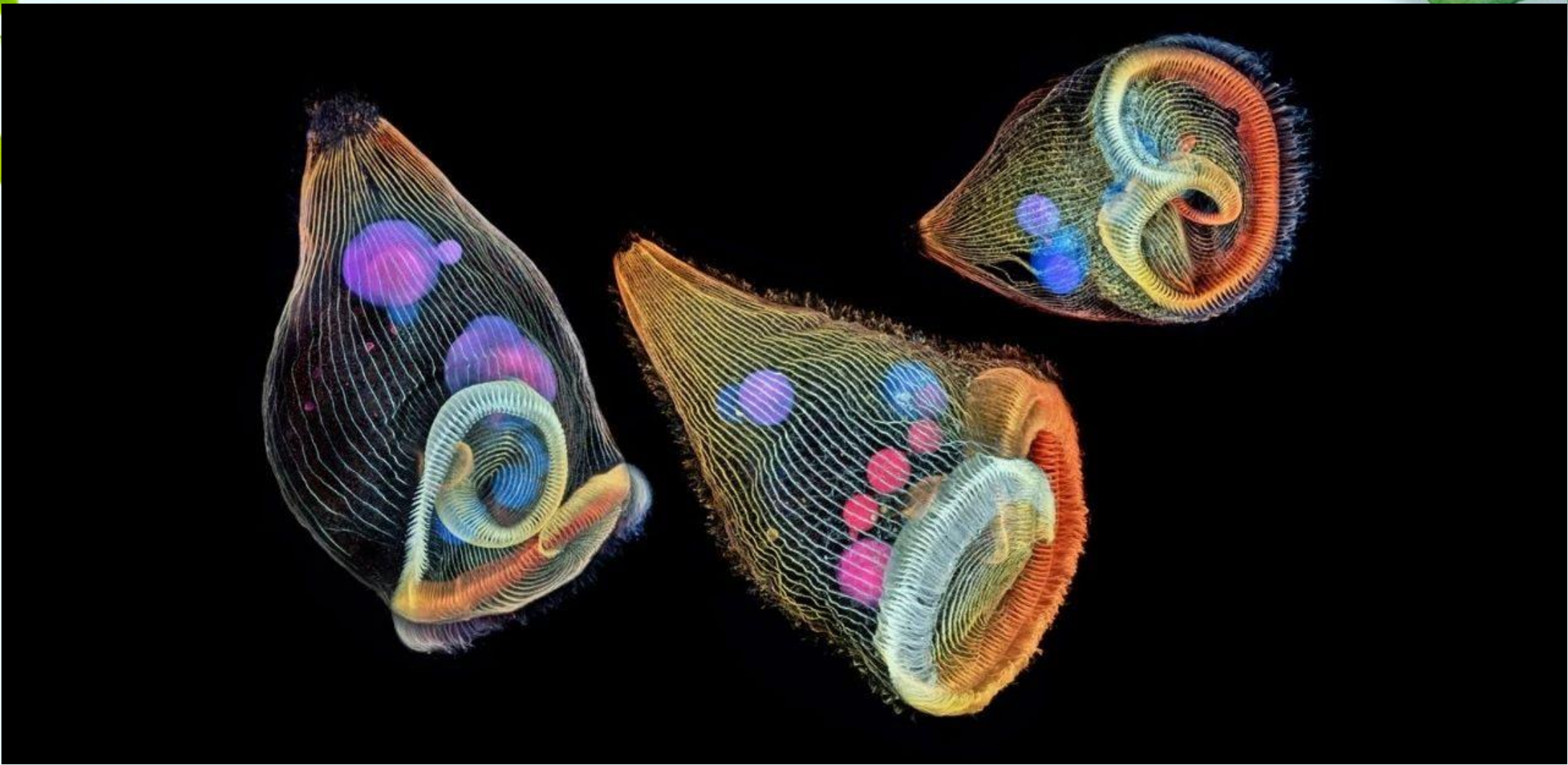
微观世界多美妙？显微摄影带你体验科学与艺术的完美结合！  
([chinagut.cn](http://chinagut.cn))



图：解剖镜下的荧光乌龟胚胎，采用荧光染色法（5x）

美国纽约罗切斯特理工学院工作，显微技术师 Teresa Zgoda 和显微摄影师 Teresa Kugler 将荧光显微技术和立体摄影技术结合起来，创造了这幅生动的图片——发育中的海龟胚胎。

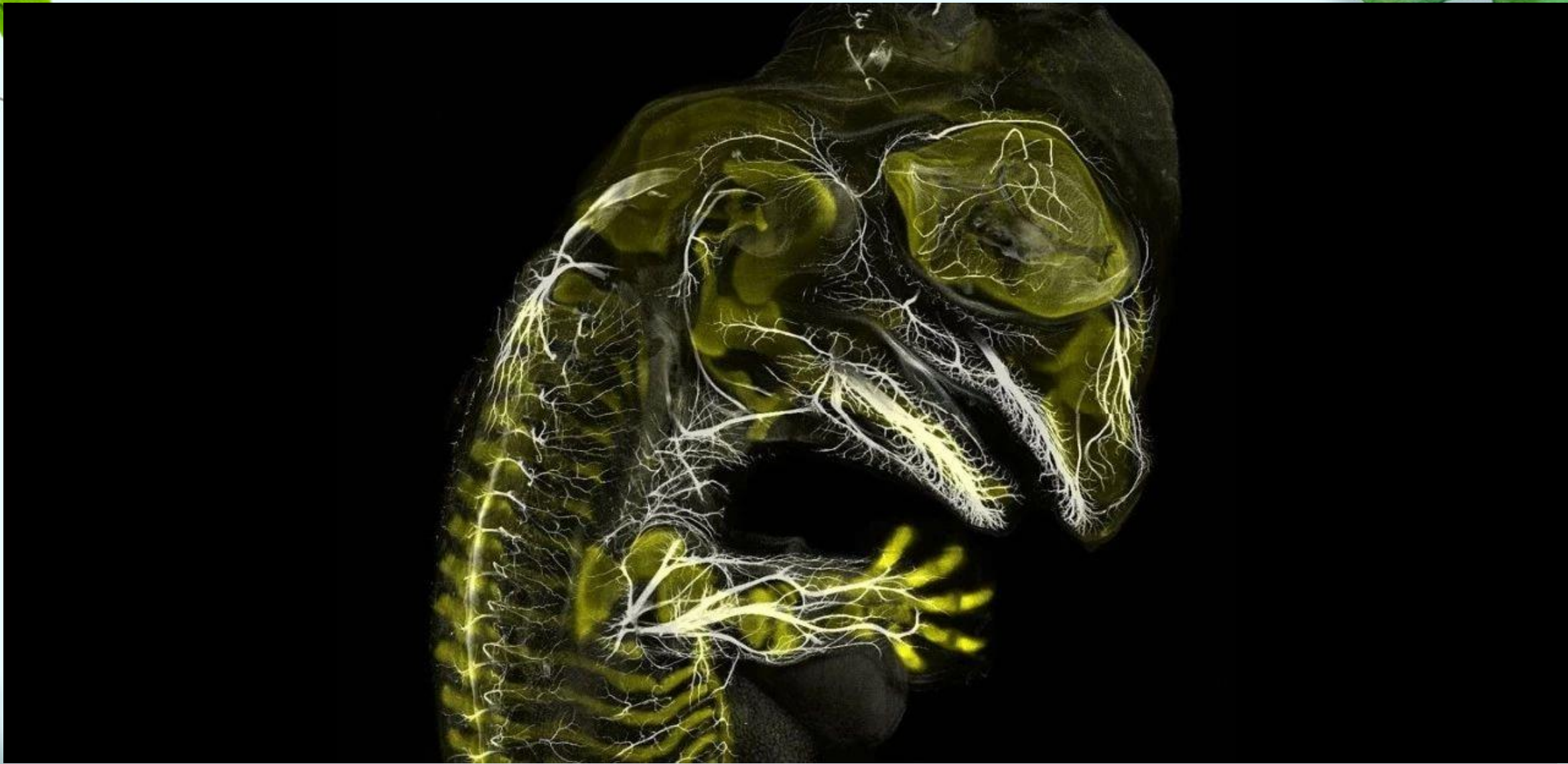




图：单细胞淡水原生动物（40x ），

采用深度彩色编码投影、共聚焦技术，该作品是来自美国霍华德休斯医学院珍妮亚研究院的一个科学家 Igor Siwanowicz 博士。此作品每个图像形如号角，栩栩如生，因含有三个单细胞生物，所以命名为“喇叭虫”。由于其被染得色彩斑斓，在黑色的背景下，能明显看到它们的纤毛和体表的茸毛，这些结构帮助它运动和捕食。





图：扬子鳄胚胎中发育神经和骨骼（10×）

在耶鲁大学古生物学与发展实验室中，Daniel Smith Paredes 博士抓拍了一张刚发育到第20天的美洲鳄胚胎。采用不同的免疫染色法，用白色显示出美洲鳄胚胎的神经轮廓，黄色显示出发育中骨骼之间的相互关。

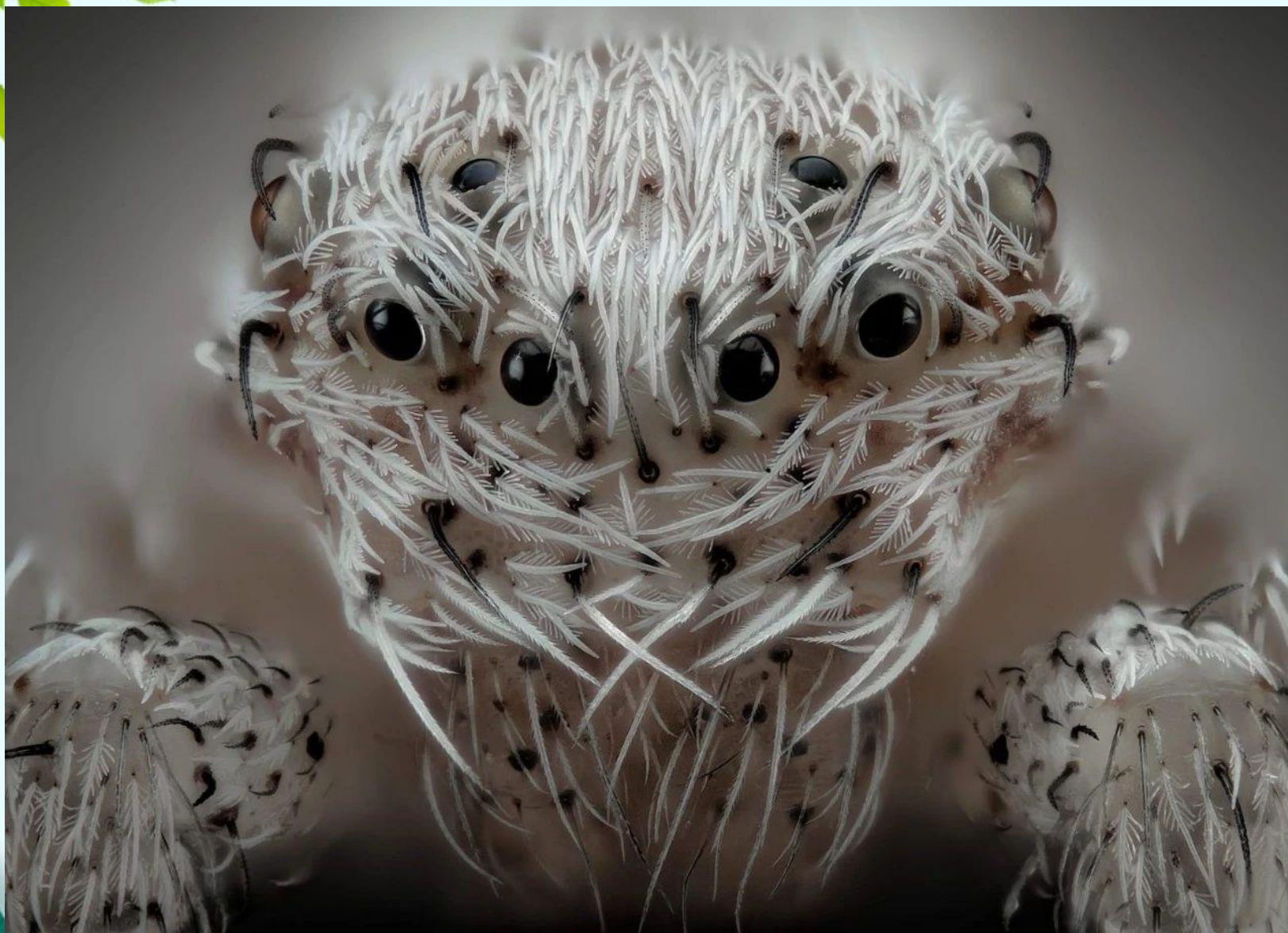




图：雄蚊（6.2x）  
采用景深合成技术  
摄影：Jan Rosenboom







图：白发婆娑的小蜘蛛（20x）  
采用反透光和图像堆叠技术  
摄影：Javier Rupérez





图：中国红康乃馨雄蕊（3x）  
采用景深合成技术  
摄影：Dr. Guillermo López López





图 郁金香芽横切面 ( 1x )  
采用反射光技术  
摄影: Andrei Savitsky

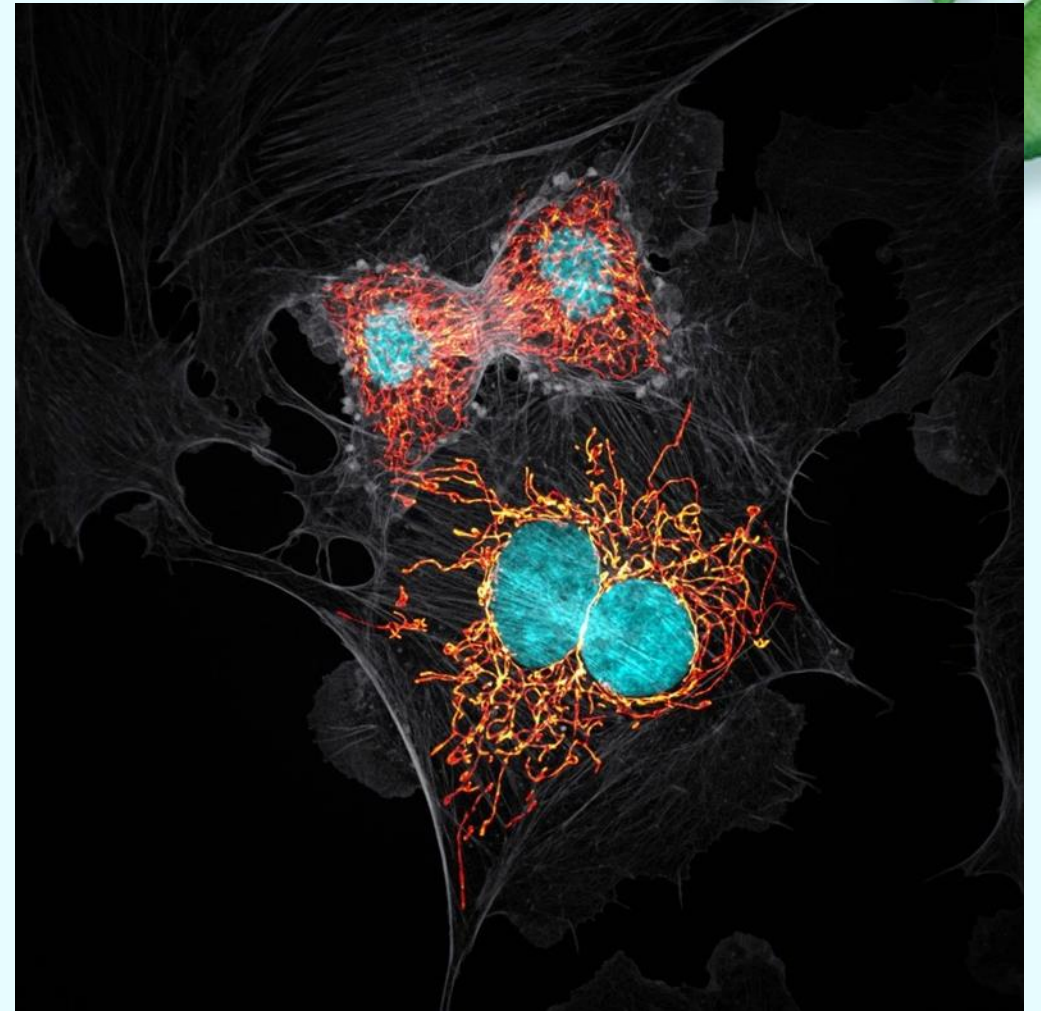
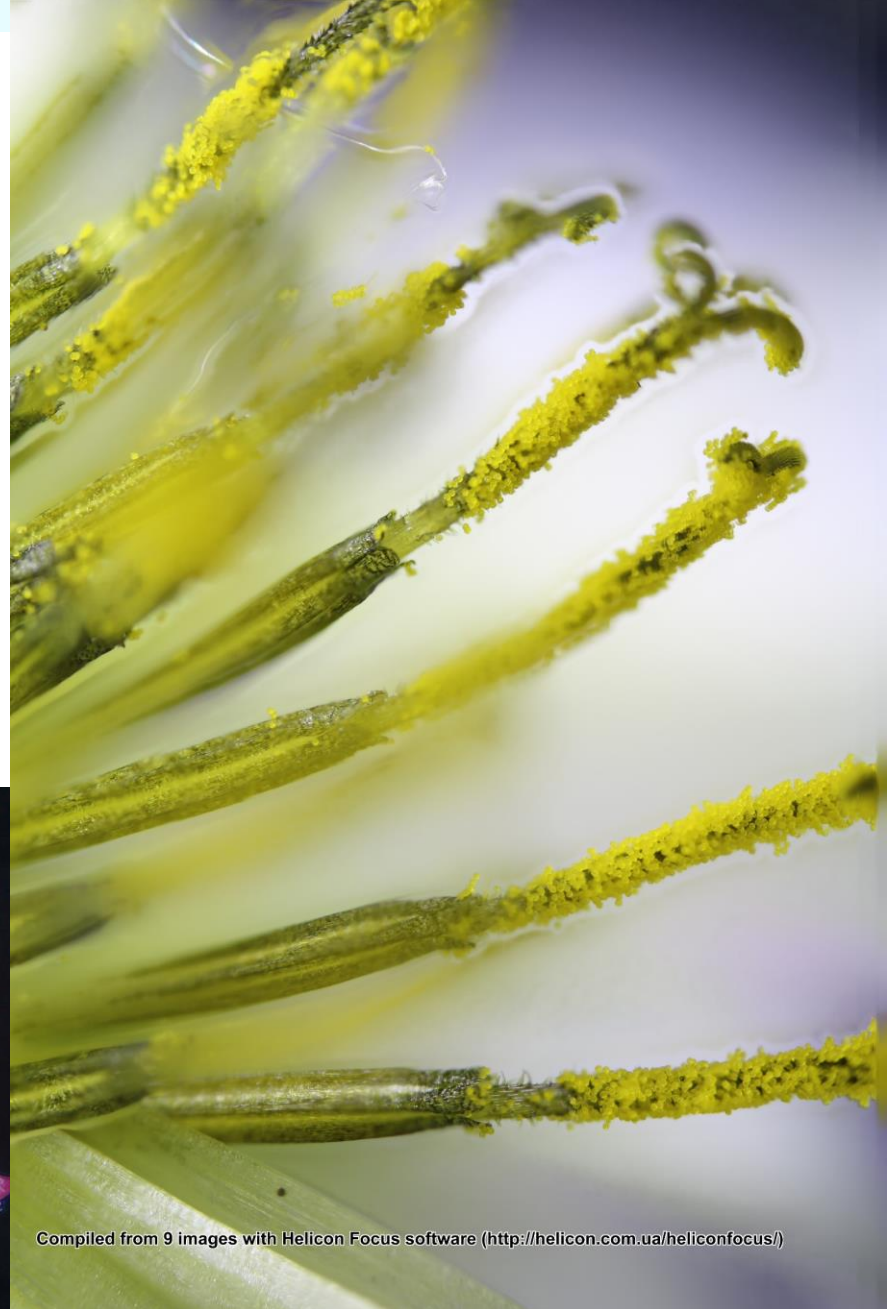


图 下拍摄的有丝分裂末期的BPAE细胞 ( 63x )  
采用镜面增强技术  
摄影: Jason M. Kirk





Compiled from 9 images with Helicon Focus software (<http://helicon.com.ua/heliconfocus/>)



Compiled from 39 images with Helicon Focus software (<http://helicon.com.ua/heliconfocus/>)



# 补充学习

- 悬浊液和乳浊液事实上也可以形成明亮的光束，所以不能用。在光线的路径上，若光遇到障碍，光的行为会有所变化，变化的性质和障碍物的直径有关，若直径小于光波长，则光路不受影响，光路不变，如在溶液中、气体中，不发生丁达尔现象；若直径接近或略大于光的波长，则光路受阻，光要绕过障碍物，发生光的散射，
- 在光的传播过程中，光线照射到粒子时，如果粒子大于入射光波长很多倍，则发生光的反射；如果粒子小于入射光波长，则发生光的散射，这时观察到的是光波环绕微粒而向其四周放射的光，称为散射光或乳光。



- 光通过浑浊媒质(烟、雾、悬浮液和乳状液等)时，浑浊介质所呈现的光的强烈的散射现象。暗视野显微镜是以丁达尔效应为基础，即以胶体粒子的反射和散射现象为基础而设计的。
- 暗视野显微镜视野内所看到的图像不是透过样品的直射光线形成的，而是由被检样品表面所散射和反射的光形成的，所以暗视野中看到看到的是被检样品的衍射光图像，非物体本身。
- 暗视野照明法是斜射照明法的一种。由于暗视野显微镜是利用被检样品表面散射的光层而观察物体的。



- 普通显微镜下可以看到 $0.45\mu\text{m}$ 的细节，而暗视野显微镜下竟能看到 $0.2-0.004\mu\text{m}$ 的极微小物体。这个范围的物体叫亚粒子，因此暗视野显微镜也可以称裂隙限外显微镜。
- 暗视野显微镜特别适用于胶体化学领域中观察溶质粒子的布朗运动，适用于观察原虫、细菌的鞭毛、伪足运动，医学检验学范围适用于观察人体体液中螺旋体、尿管形、结晶或各种粒子。在这一点上，暗视野显微镜远比其他种类显微镜要优越得多。
- 在普通显微镜下看不见的微小活体，不染色生物体样品标本，

- 暗视野显微镜常用来观察未染色的透明样品。这些样品因为具有和周围环境相似的折射率，不易在一般明视野之下看的清楚，于是利用暗视野提高样品本身与背景之间的对比。这种显微镜能见到小至 $4\sim 200\text{nm}$ 的微粒子，只能看到物体的存在、运动和表面特征，不能辨清物体的细微结构。