

國立嘉義大學植物學實習

班級		姓名		學號		組別	
日期	年 月 日	顯微鏡編號		玻片號碼			
題目	顯微鏡之構造及使用方法						

顯微鏡 (microscope) 由字首詞 micro (拉丁文意指微小) 與字尾詞 skopos (希臘文指觀察)。顯微鏡是一種特殊設計的儀器，用以研究一般肉眼無法觀察的微小物體，使人們的視覺領域增廣到微小物體的世界。各種形式的顯微鏡均由一組鏡片所組成，且其主要差異在於所使用的光源種類、波長、鏡片系統的特性與排列以及觀察影像所使用的方法。一般而言，用來觀察生物的顯微鏡依光源和透鏡系統的不同來區分，利用一般光線經過透鏡聚焦後，使物體形成物像以便觀察者，有解剖顯微鏡 (stereomicroscope) 及光學顯微鏡 (optical microscope)；利用雷射光者有雷射掃描共軛焦顯微鏡 (laser scanning confocal microscopy, LSCM)；利用波長極短的電子束的電子顯微鏡 (electron microscope)，經電磁透鏡聚焦，使極小的物體成像，常用的有掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 和穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM)。

顯微鏡有不同的放大率，有將物體放大 4 至 40 倍的雙眼立體解剖顯微鏡 (stereoscopic dissecting microscope)；有將物體放大 100,000 倍的電子顯微鏡 (electron microscope)；但常用的光學顯微鏡 (light microscope) 之放大率約為 100 至 900 倍。最好研究用的光學顯微鏡可將原物放大至 1,500 倍左右。

由於人的眼睛在構造上的限制，一般而言，兩個物體相距超過 0.2 mm 時，肉眼才能區別出來，因此要觀察微細的構造，就必須依靠顯微鏡。而影響顯微鏡看到清晰影像因素有三，分別為放大倍率 (magnification)、對比度 (contrast) 與解像力 (resolution)。放大倍率乃指透過顯微鏡後物體所呈現的影像與實物大小的比值；對比度則為主體與背景明暗差別程度，通常高對比度的影像較為清楚；解像力則為一光學系統中所區分兩點間最小距離能力，如人眼睛的解像力為 0.2 mm，小於 0.2 mm 時，肉眼即無法區別，因此 0.2 mm 稱為肉眼的最高解像力。一般光學顯微鏡其最高解像力為 0.2 μ m，比肉眼小 1,000 倍，因此 1,000 倍稱為光學顯微鏡的最大有效放大倍率。

一、顯微鏡 (microscope)

(一) 解剖顯微鏡 (stereomicroscope)

解剖顯微鏡又稱立體顯微鏡或實體顯微鏡，其特性為具有較長的工作距

離，因此有利於各項物體外觀觀察之操作。而且解剖顯微鏡利用倒像稜鏡組使物鏡的倒像反正，讓使用者有實物觀察的感覺。因為解剖顯微鏡有立體的影像，然而相對地由於提升了觀察物件之景深解像率便無法太高，放大倍率在 60 倍以下，解像效果較佳。解剖顯微鏡主要是用來觀察不透明的物體或生物標本外部形態。

(二) 光學顯微鏡 (optical microscope)

光學顯微鏡主要是用來觀察生物體的器官組織結構或生物細胞的內部構造。具有二組透鏡，一組是接近觀察之標本的透鏡稱為接物鏡或簡稱為物鏡 (objective lenses)，另一組是靠近眼睛稱為接目鏡或簡稱目鏡 (ocular lenses or eyepieces)。物鏡位於物體標本上方而由上往下觀察者為正立光學顯微鏡；物鏡位於物體標本下方而由下往上觀察者為倒立光學顯微鏡。一般所觀察的呈像方式為明視野 (bright field)，但因所要觀察物特性或欲呈像之不同，有特別的附屬呈像系統。

1. 明視野 (bright field)：最基本的觀察模式，主要是用來觀察透明或近乎透明的材料。此種顯微鏡觀察用的材料，大都需用經過事先的處理和切成薄片後，才可以在顯微鏡下觀察。

2. 暗視野 (dark field)：可將要件架設於明視野顯微鏡之主體上，利用一個不透光的濾片遮掉聚光鏡上大部分的光線，僅聚光鏡邊緣的光線可以通過，結果使整個視野變暗，而標本物體的輪廓變亮，適合用於觀察小而薄、近乎透明或纖細的構造，如細菌或鞭毛或用於微小個體的計數。

3. 相位差 (phase contrast)：可將要件架設於明視野顯微鏡之主體上，利用光波通過標本物體時，速度會被減緩或加速而與通過封片介質之光波產生“不同相位 (out of phase)”的現象，造成光波互相干擾形成明暗對比，用以觀察透明無色的物體。此類顯微鏡之聚光鏡有一位相環 (phase ring)，物鏡內有一位相板 (phase plate)(鏡頭外刻有 Ph 字樣)。當光線通過標本時光波行進速度受影響，而與其他光線產生約 90° 的不同相位，再利用物鏡內之位相板加強干擾作用，使通過物體邊緣的光加速，而與通過物體的光成 180° 度的不同相位，形成破壞性干擾 (destructive interference) 使物體影像變暗，但具有明亮之輪廓。

4. 螢光 (fluorescence)：以波長較短的紫外光為光源，利用紫外光射在螢光物質上會激發出可見光的特性，適合用於特定細胞之鑑別與定位。

(三) 雷射掃描共軛焦顯微鏡 (laser scanning confocal microscopy, LSCM)

是在螢光顯微雷射掃描裝置，使用紫外光或可見光激發螢光探針，從一個點光源發射的探測光通過透鏡聚焦到被觀測物體上，如果物體恰在焦點上，那麼反射光通過原透鏡應當匯聚回到光源，這就是所謂的共軛焦。

二、光學顯微鏡 (optical microscope)之構造

(一) 支鏡系：

1. 瞳孔間距刻度 (interpupillary distance scale)：調整最適當的瞳孔間距，使雙眼同時看到樣本，瞳孔間距刻度範圍 53 mm 至 72 mm。
2. 雙眼鏡筒 (binocular tube)：內有透光系統。
3. 觀察筒束緊環 (observation tube clamping screw)：固定雙眼鏡筒。
4. 顯微鏡支架或鏡臂 (microscope stand)：支持或固定雙眼鏡筒、調節輪、集光器及鏡座。
5. 旋轉盤 (revolving nosepiece)：接於鏡筒之下端可以旋轉的部份；以便更換低倍鏡及高倍鏡。
6. 載物臺 (stage)：放置標本玻片之平臺，臺面有一樣本夾 (specimen holder) 可固定標本玻片，載物臺之中央有一圓孔，可使下面光線通過，臺面右側有前後及左右之移動鈕 (low drive coaxial stage controls)。
7. 鏡座 (base)：位於最底部用以支持顯微鏡之各部，具有電源開關及光度調節器 (voltage control dial)。

(二) 透鏡系：

1. 目鏡 (ocular lenses or eyepieces)：

位於鏡筒之上端，通常有 5X、10X、15X、20X，長者為低倍鏡，短者為高倍鏡，目前裝有 10X。目鏡內可安裝有目鏡測微器與指針。雙目鏡之顯微鏡其兩目鏡距應調整與使用者之瞳孔距相等，如此才能看到單一的視野和影像。肉眼與目鏡距離應適當，才能看到鏡頭裡的整個影像。左邊之目鏡有一視差校正調整環 (diopter adjustment ring)。

2. 物鏡 (objective lenses)：

裝於旋轉盤上，通常有四個，分別為 4 X (scanning power objective)、10 X (low power objective)、40 X (high power objective)、100 X (oil immersion objective)，短者為低倍鏡，長者為高倍鏡。每一個物鏡有固定之放大倍率 (magnification, M)、數值光圈 (numerical aperture, NA) 與工作距離 (working distance)。物鏡之放大倍率 介於 2 X~100 X 之間，40 X~80 X 者稱為高乾鏡頭 (high-dry lenses)，90 X~100 X 者稱為油鏡

頭 (oil-immersion lenses) (通常標有黑色或其他顏色之環圈，並標示 NA 值大於 1.0)。物鏡外常刻有一行數字，如 40/0.65/0.17，其意義分別為：放大倍率 40 X、數值光圈 (numerical aperture, NA) 為 0.65、蓋玻片之最大容許厚度為 0.17 mm。

顯微鏡的放大倍率 = 目鏡倍數 × 物鏡倍數。

數值光圈表示物鏡捕捉光線的能力：數值越高，捕捉光線的能力越強，亦即物鏡之解像能力越佳。工作距離 (working distance) 指成像時物鏡與標本表面的間距，與放大倍率成反相關。

(三) 校光系：

1. 集光器 (聚光器 condenser): 位於載物臺下，由多數透鏡 (lens) 所組成，用以集中由光源來之平行光線，使其照射於樣本上，可上下移動，以求適宜之光線。
2. 光圈 (虹膜式光圈 iris diaphragm): 位於集光器之下端，有一調整柄 (aperture diaphragm control) 可任意改變其光圈孔徑大小，以調節視野之明度。
3. 光源 (light source): 位於鏡座上，內設光源為鎢絲燈，可接上電源，開關位於鏡座上，可由光度調節器控制光強度。
4. 焦點調節輪 (adjustment screw): 鏡臂兩旁裝有粗調節輪 (coarse adjustment) 及細調節輪 (fine adjustment)，齒輪順時針轉動，載物臺上升，反之下降，粗調節輪轉一週可調節 25 mm，細調節輪轉一週可調節 0.25 mm。粗調節輪用以上下移動載物臺使其達到與標本間近於正確之距離。細調節輪使鏡筒上下稍微移動，使焦點之調節較為精確。粗調節輪張力環 (tension adjustment ring) 用來調整粗調節輪之鬆緊度。預對焦桿 (前置-對焦平台鎖定桿 pre-focusing lever) 用於粗略對焦 (coarse focusing)，必要時才可使用，使用後需復歸。

三、顯微鏡的使用方法：

1. 以雙手將顯微鏡自架上取下，一手握鏡臂，一手托住鏡座，將顯微鏡拿至桌上，放在自己的正前方，使鏡臂對向自己，調整自己與顯微鏡的最適距離和適當的座位高度，以便可以舒適的使用顯微鏡。
2. 若須移動顯微鏡，務必將顯微鏡提起再放至適當位置，在桌面上推動顯微鏡所造成的震動可能會導致顯微鏡內部零件的鬆動，使用顯微鏡請務必小心輕放。
3. 接電源，打開電源開關，並調整光度至中光量及檢視顯微鏡之狀況。

4. 轉動旋轉盤時載物台降至最低點，以免因操作不當而刮傷接物鏡之鏡頭。先使用 4X 物鏡，並將 4X 物鏡置於載物臺中央有一圓孔上方。再放置樣本於載物臺上，並用樣本夾固定，然後運用載物臺前後及左右移動鈕，轉到觀察的位置。
5. 對焦過程可先將物鏡調到與觀察玻片最接近的距離再以調節輪先往下方向或再往上方向轉，以避免物鏡與玻片的碰撞，而破壞樣本並造成物鏡的損壞。
6. 從目鏡觀察，並轉動粗調節輪直到看見標本為止，再轉動細調節輪，使欲觀察的標本得到正確的焦距，產生最清晰的物像。
7. 若光線太強或太弱，則調整集光器上的光圈至各人最適光度，以獲得適當的光度及清晰的物像。
8. 若對標本進行細部觀察時，則須使用高倍物鏡來觀察。尋找出觀察的標本部位，並將之置於視野的中央。轉動旋轉盤 (不可用手去摸物鏡)，將低倍的物鏡更換成高倍的物鏡，利用粗及細調節輪對焦。通常由低倍換成高倍觀察時，光度會不足。此時可轉動光圈或光源調節鈕，以得到適當的光度。
9. 觀察完一種材料，欲更換另一種材料時，務必將載物台下降至最低點，換好玻片後再依標準程序重新對焦，切勿直接抽換標本，以免刮傷鏡頭或玻片標本。
10. 用畢顯微鏡應將載物臺下降至最低點，並將低倍鏡對準載物臺中央圓孔處，將電源線捲好，蓋上防塵罩，並收入存放櫃中。

四、 瞳孔間距與視差校正調整環的操作：

1. 直接左右移動目鏡直到雙眼均能看到樣本，並記下瞳孔間距刻度，第二次再使用時，可直接調到最適瞳孔間距刻度。
2. 用右眼看右邊目鏡內樣本的固定點 (左眼張開，並用白紙遮住左邊目鏡)，利用焦點調節輪對焦至最清晰的物像。然後再用左眼看左邊目鏡內樣本的固定點 (右眼張開，並用白紙遮右邊目鏡)，以視差校正調節環來對焦 (不可用焦點調節輪對焦)。移開白紙用使兩眼所看到的目鏡內樣本的固定點是依樣清晰。如果兩眼所看到的固定點仍不一致，重複此步驟 2~3 次，直到兩眼都看清視野。

五、 測微器的使用

1. 光學顯微鏡是利用目鏡測微器 (ocular micrometer) 來測量受觀察物體的實際大小。
2. 目鏡測微器是一直徑為 20 mm 的圓形玻片，玻片上有一段劃分為 100 小格的線段。目鏡測微器上的每一小格寬度是未知的，因此在使用前，要先測量出每一小格的寬度，才可用來計量物體之大小。
3. 使用載物臺測微器 (stage micrometer) 校正目鏡測微器每一小格的長度。
4. 載物台測微器是一種長方形的玻片，玻片上有一段 1 mm 的線段，該線段劃分為 100 小格，每一小格寬度是 0.01mm (=10 μ m)。
5. 目鏡測微器每一小格的寬度=(載物臺測微器第二重疊刻度 \times 10 μ m)/目鏡測微器第二重疊刻度。

六、 顯微鏡的清潔與保養

1. 保養顯微鏡時，首先將顯微鏡上之灰塵除去；清潔物鏡時，僅能使用沾有清水或鏡頭清潔液 (ethanol : acetone : ether=4 : 4 : 1, V/V/V 或酒精 : 乙醚=3 : 7 或二甲苯 (xylene)) 之拭淨紙小心擦拭。
2. 非油鏡頭切忌沾染油漬，若不慎沾染，應立即使用鏡頭清潔液拭淨；每次使用油鏡頭後，均需將之拭淨後才可以收入顯微鏡箱。
3. 不可將目鏡取下或拆解顯微鏡。
4. 插頭插電或拔除插頭請手握插頭，請勿捉線拔除插頭。