

M. 弗朗松



相衬显微镜 与 干涉显微镜

科学出版社

相衬显微镜与干涉显微镜

M. 弗朗松 著

张炳勳 译

马士修 校

科学出版社

1966

Морис Франсон (Maurice Françon)
ФАЗОВО-КОНТРАСТНЫЙ И
ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ МИКРОСКОПЫ

Государственное издательство физико-математической литературы
Москва 1960

内 容 简 介

在显微镜下对最重要也最有兴趣的生物体——细胞——的观察和研究，迫使学者寻求一些方法，以提高介于被研究物体与其背景之间的衬度。当用普通的方法照明时，这种衬度实际上是不存在的。采用染色的方法会给被观察机体的生命力带来有害的影响，其它的一些方法（如斜光束照明法，暗视场法以及焦散法等）相当复杂，并且会使物体与其象之间的相似性受到歪曲。在目前，为了观察透明物体以及反射的金相剖面，卓有成效地应用了两种显微镜：相衬显微镜和干涉显微镜。本书叙述了这两种显微镜的工作原理。

本书的叙述简单而明晰，内容充实，所以对于广大科学工作者，工程师，物理、化学、生物与医学专业的研究生和高年级学生都是很有裨益的。

本书由张炳勳根据俄译本（Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы，1960年版）译出，先由于美文按俄译本校阅一遍，最后由马士修根据法文原书（Le microscope a contraste de phase et le microscope interférentiel，1954年版）作了校正与修改。

相衬显微镜与干涉显微镜

М. 弗朗松 著
张炳勳 译
马士修 校

*
科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号
北京市书刊出版业营业许可证出字第061号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1966年4月第一版 开本：850×1168 1/32
1966年4月第一次印刷 印张：4 9/16 插页：1
印数：0001—2,750 字数：117,000

统一书号：15031·226
本社书号：3406·15—1

定价：[科六] 0.75 元

俄文版序言

在显微镜下观察与研究最为重要也是饶有兴趣的生物体——细胞——时的巨大困难,迫使学者不得不寻求一种方法,以提高被研究的物体与其背景之间的衬度。因为这种衬度在一般的照明条件下实际上等于零,亦即细胞的结构将消失在其周围介质之中,为了这一目的曾采用过各种染色的办法,但是,这种办法会给有机体的生命力带来有害的影响。另外的一些办法,例如斜光束照明法、暗视场法以及焦散法等等,也存在着严重的缺点。这些方法会使物体与象之间的相似性受到歪曲,并会招致非本质的细节,此外,当应用这些方法时,还不得不装置相当复杂的设备。

目前,为了观察透明物体与反射的金相剖面,卓有成效地使用着两种类型的显微镜:相衬显微镜与干涉显微镜。关于相衬显微镜的原理是蔡尔尼克(Zernike)在1935年提出的,至于干涉显微镜则采用了在显微观察条件下的迈克尔逊(Michelson)干涉仪的原理[萨纳克(Sagnac)在1911年,特别是В. П. 林尼克(Линник)在1933年的工作]、由弗雷德里克斯(Frederikse)(1933年)移用到显微镜中的法布利-白洛(Fabry-Perot)干涉仪原理以及双折射的原理;关于双折射的应用是贾明(Jamin)在1866年首先提出的,而А. А. 列别杰夫(Лебедев)则首次将之应用于显微镜中(1931年)。

弗朗松的这本书“相衬显微镜与干涉显微镜”,给读者论述了以上列举的各种方法的发展过程及其实际应用。本书的最大特点是既简练而又完备,内容深刻但叙述通俗而透辟,这是因为作者具有丰富的实际经验(很多讲到的仪器是作者本人与其同事们制做的)与长期的教学实践。所有这些特点是将本书译成俄文的充分理由。

本书可供实验物理学者、生物学者以及其他在自己的工作中
使用显微镜的专家等广泛读者阅读。

Г. 斯留薩列夫

目 录

俄文版序言	iii
绪论	1

第一部分 显微镜成象理论导论

第一章 发光点的象的结构	2
§ 1. 理想仪器	2
§ 2. 具有中央光屏时的衍射花样	8
§ 3. 当显微镜失调时发光点的象	9
§ 4. 衍射斑的“抑制”	11
§ 5. 实际仪器	15
第二章 广延物体象的结构	23
§ 6. 非相干光照明下的象	23
§ 7. 相干光照明下的象	28
§ 8. 分辨极限与识别极限	35
§ 9. 照明方法的影响	40

第二部分 观察透明物体的一些方法

第三章 相衬	44
§ 10. 关于透明物体的一般概念	44
§ 11. 方法的一般原理	44
§ 12. 周相移动 $\pi/2$ 的实现	49
§ 13. 象的衬度; 方法的灵敏度	50
§ 14. 在显微镜中的应用	52
§ 15. 相板	53
§ 16. 相板的安装方法	65
§ 17. 观察反射物体的相衬显微镜	69

§ 18. 显微镜用相板的一般特性, 调节, 分辨能力.....	74
§ 19. 颜色相衬.....	79
§ 20. 相衬方法的应用.....	80
第四章 干涉显微技术.....	89
§ 21. 一般原理.....	89
§ 22. 双光束干涉显微镜.....	90
§ 23. 多光束干涉显微镜.....	100
§ 24. 应用偏振现象的干涉显微镜.....	108
参考文献.....	125

緒 論

在研究显微镜的成象并对它们进行阐释的时候，不能仅基于几何光学的概念。在这里必须如同艾利 (Airy) 所做的那样，引入物理光学的概念。他第一个计算了由理想仪器所给出的一个点的象内的照度分布。这时所得到的称为艾利圆的衍射花样乃是理想的象，这种象可用不存在象差并且严格调焦的显微镜获得。广延物体的象则可用比较复杂的将部分的象迭加起来的过程得到。衍射理论的基本知识，对于希望正确无误地说明所观察的象的实验人员来说是非常需要的。

因此，我们将首先从对发光点成象的理论研究开始，其次讨论在相干光与非相干光照明下广延物体的成象理论。此后，我们还要研究由于象差存在时以及显微镜调焦并非充分敏锐时所招致的象的变形。我们不涉及这些问题的纯粹数学方面的进展，但要强调指出一般的原理和实际应用的重要结果。

在初步地熟悉了成象理论之后，我们以后就会毫无困难地转入观察方法的讨论。我们将详细地研究相衬方法，诸如它的原则、理论和灵敏度等。

对于包含不同的周期结构的复杂的象的解释，也将给予实际的指导。我们同样认为，给出某些装置和仪器的详细描述是必要的。本书的一部分内容是有关干涉显微技术的，因为这种技术为研究人员提供了一系列的可能性。我们将给出主要的干涉方法的原则与理论，并对各种各样的仪器加以描述。

本书也将给出应用相衬方法的一般知识。这种应用对于干涉显微镜同样有效，因为这两种方法的目的都是为了观察透明物体。

第一部分 显微鏡成象理論导論

第一章 发光点的象的結構

§ 1. 理想仪器

我们提出的第一个问题是(图1): 给定被研究的标本为一点状的发光物体 A ; 试问在观察平面 π 上象 A' 的结构是怎样的? 我们假设, 物体 A 的尺度较所选用的显微鏡物鏡 O 的分辨极限小得多, 并设此物体辐射出单色光. 在物空间波面乃是具有中心点 A 的一些球面波 Σ . 假如物鏡 O 为理想的, 则在象空间内的波面同样也应当是中心在 A' 点的一些球面波 Σ' .

根据惠更斯 (Huygens) 的成象原理, 象 A' 是这样形成的, 即认为波面 Σ' 上的不同点均为真实的相干光源. 任一点 M 不只是向 MA' 方向辐射出光振动, 而且部分地向其他方向辐射光振动, 如图 1¹⁾ 所示. 也就是说, 波面 Σ' 上不同的点均向各个方向“衍射”光线. 由此就可明白, 为什么象 A' 不是一个点而是一个很小的亮斑. 不仅在 A' 点, 而且在 A' 邻近的各点也同样受到了照明. 实际上, 由波面上任一点 M , 在不同的方向所衍射的光强度是不同的. 甚至稍微偏离几何光线 MA' 的方向, 衍射光的强度也会非常迅速地减弱.

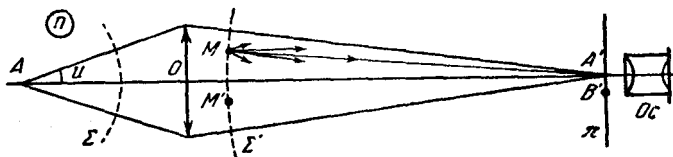


图 1

1) 在此图上及以后的各图上均以字母 O_c 表示目鏡.

今后我们将认为,物镜的直径与由物镜到象面的距离 OA' 比较起来为甚小。因为我们所研究的范围紧紧靠近 A' 点,故衍射光线的强度可以认为不变,并且与几何光线方向的偏离也甚小。

图 1 表明,所有由这一波面上各点辐射的光振动,将同时会聚于 A' 点,因为 A' 点乃是球面 Σ' 的中心。也就是说,由球面 Σ' 上辐射的振动会聚于 A' 是“同相”的。在这种情况下, A' 点上光振动的振幅,乃是由波面 Σ' 上所有各点辐射的光振动振幅的简单代数和。如所周知,光强度正比于振幅的平方。为了得到 A' 点的光强度,只需将此振幅的总和自乘即得。

在与 A' 点毗邻的各点上,情况便与此不同。实际上, B' 点并不与球面 Σ' 的中心相重合,并且由 B' 点到波面 Σ' 上的不同点 M 的距离互不相等;由 Σ' 所辐射的光振动不能同时到达 B' 点,亦即这些振动在 B' 点不是“同相”的。当 B' 点处于某些特殊位置时,可以在波面上找到这样的两个点 M 和 M' ,由这两点发射的光振动能够彼此完全抵消。此时就称光振动反相。如果对于波面上所有各点的组合发生了这种情况,则象面 π 上的 B' 点将是暗的。由图 2 很容易解释这种现象。

根据光的波动本性的假说,光振动可以用正弦振动的形式 $y = a \sin x$ 表示,式内 y 是振动位移; a 是它的振幅; x 是振动的位相。

在图 2a 上表示出了这种类型的振动图形。图 2b 则表示由波面 Σ' 上 M 点(参阅图 1)辐射的并会聚于 A' 点的光振动。由任意的另外一点 M' 辐射的光振动,与以上的振动类似,因为它与由 M 点辐射的振动同时达到 A' 点,故可采用同样的正弦曲线表示。如图 2b 所示,由 M' 点辐射的振动恰好位于由 M 点辐射的振动之下。在 A' 点的振动振幅乃是由 M 与 M' 点射来的振动振幅之和(此和表示于图 2b 的下部),并且等于单个振动振幅的二倍。

现在我们来研究 B' 点的情况。假定由 M 与 M' 点辐射的并且反相地会聚于 B' 点的振动,在图 2c 上用头两个曲线表示。曲线对横坐标轴对称,并且在迭加后彼此完全相消;结果振幅等于

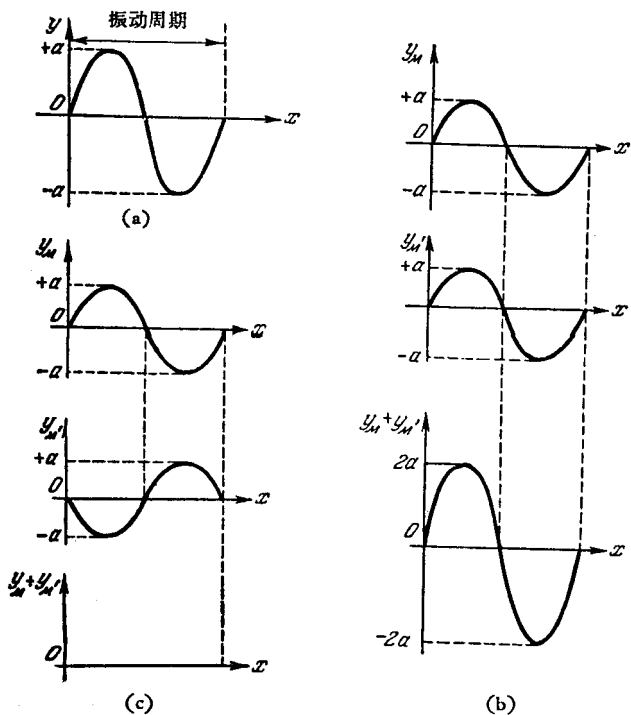


图 2

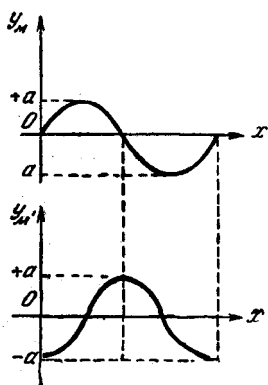


图 3

零。

还可产生另外一种情况。此时达到 B' 点的二振动,其相对位置如图 3 所示。由 M' 点辐射的振动,对于由 M 点辐射的振动而言位位移了四分之一周期。在此情形下, B' 点的光强度等于迭加振动振幅的平方和。为了研究 B' 点上的光强度,当然不仅需要计算 M 与 M' 两点的作用,而且需要计算波面 Σ' 上所有点的综合作用。此时将遇到了除了我们刚才提到的两种情况以外的所有中间情况。计算

给出如下的结果：由于波面 Σ' 上所有各点的光振动衍射的结果，象 A' 的形状为一中央亮斑并依次绕以亮暗相间的圆环(图 4)。但是，各圆环的光强度则随着远离中心而急剧降低。

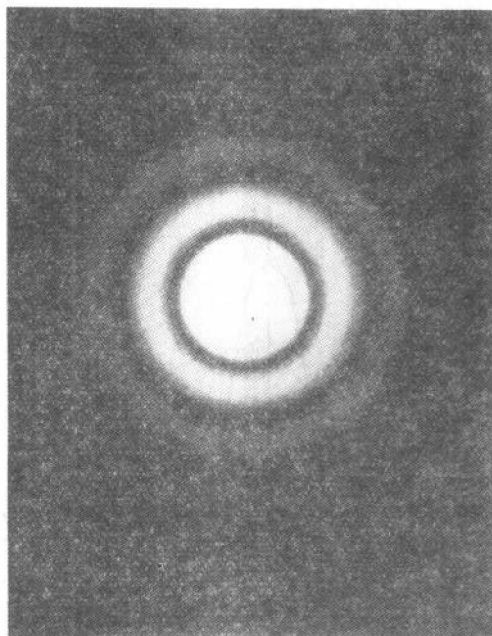


图 4

图 5 给出了象斑的结构，这种结构就是所谓衍射花样。纵座标表示光强度 I ，横座标表示离开几何中心 A' 点的距离。横坐标轴上所表示出的参数 W ，不仅与到几何中心点 A' 的距离有关，而且与物镜的性能有关，参数 W 可由以下的方法来计算。设 λ 为光波波长； n 为浸液的折射率； u (参阅图 1) 是 A 点发出的光束的最大角孔径； g 为物镜的放大率； c 是欲计算光强度的点距 A' 点的实际几何距离。则由衍射理论可导出 W 的表示式

$$W = \frac{2 \pi n \sin u}{\lambda} \frac{c}{g},$$

式中 $n \sin u$ 乃是显微物镜的数值孔径。计算表明，第一个暗环与

$W = 3.83$ (图 5) 的数值对应; 由此即可算出象平面 π 内中央衍射斑的半径 c 。上述方程式给出

$$c = \frac{W \lambda g}{2\pi n \sin u} = \frac{3.83 \lambda}{3.14 \times 2n \sin u} g,$$

或

$$c = \frac{1.22 \lambda}{2n \sin u} g.$$

这就表明, 为了得到含有尽可能微小的细节的象, 必须采用相当大的数值孔径。

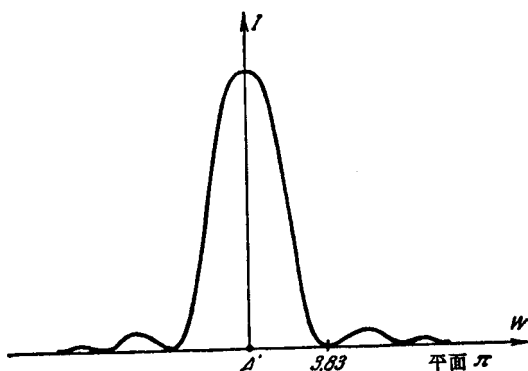


图 5

例如, 取数值孔径 $n \sin u = 1$, 放大率 $g = 50$ 。取光波波长的平均值 $\lambda = 0.0006$ 毫米或 $\lambda = 0.6$ 微米, 则有

$$c = 0.018 \text{ 毫米}.$$

这样一来, 情况犹如在物空间以半径为

$$\frac{c}{g} = \frac{0.018}{50} \text{ 毫米或 } 0.36 \text{ 微米}$$

的小圆代替了点状物体 A 一样。

当数值孔径等于 1.3 时, 则有

$$\frac{c}{g} = 0.28 \text{ 微米}.$$

图 6 表示在物空间内与不同的数值孔径对应的衍射圆。

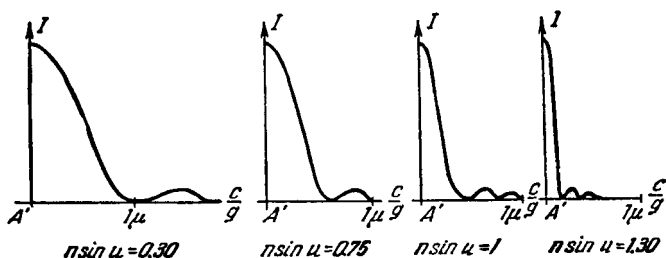


图 6

光通量的分布

所有由发光物点辐射并进入显微镜的光能分布在一个小的衍射斑内。因为这种衍射斑是一个迴转图形，所以可以将它视为使图 5 上的曲线绕纵座标，亦即绕表征强度 I 的轴线旋转而得的迴转体的体积。可以认为，由这种方法所得到的迴转体的体积，与由点源射入显微镜的光流成正比。通过简单的计算就能得到这一体积的大小。我们把由图 5 上的曲线所形成的迴转体的整个体积当做一个体积单位。这种迴转体就是所谓“衍射体积”，它在理论上应与 W 扩展至无穷大的数值对应，但在实际上，因为强度随 W 的增大而急剧减小，故而研究 W 很大的数值是没有什么意义的。同时，不采用 W 等于无穷大的数值，误差也可以很快地变得极其微小，并且所得到的整个衍射体积也会具有足够的精度。

假如将衍射体积计算到数值 $W = 3.83$ ，则可得到中央衍射斑的体积。这一体积等于整个体积的 84%。研究这一体积是非常重要的，因为正是这一体积对于成象起着主要的作用。而环绕中央衍射斑的亮环只会使象弥散并起着寄生的作用。因为整个衍射体积取为 1，故而到达所有的衍射环上的无用的光通量等于 $1 - 0.84 = 0.16$ 。

由此可见，中央亮斑约损失 20% 左右的光通量于衍射环上。但是，更严重的是，在广延物体的象上，这种散射光形成了象的朦胧，从而引起象上反衬的普遍降低。在标本上常常遇到亮度很弱

的微小细节位于非常明亮的较为硕大部分的邻近。在这种情况下,由明亮物体所形成的衍射环,其强度可能较诸强度不大的细节的中央亮斑的强度大很多,以致这种细节可能在观察时消隐不见。

此后我们将会看到,借助于所谓“抑制”的方法,依靠中央衍射斑的少许扩大,就可使衍射环消失,

§ 2. 具有中央光屏时的衍射花样

在某些情况下,通过显微物镜所形成的波面 Σ' , 可用一不透光的光屏部分地加以遮拦, 这种情况特别会在反射式的物镜中遇到。在这种仪器内(图 7), 由物体 A 发出的光线投射于反射镜 M 上, 经过小反射镜 m 的反射最后会聚于象点 A' 。由于反射镜 m 的存在遮住了由物点 A 射出并投射到 M 上的光束, 波面 Σ 与 Σ' 具有圆环的形状。可以料到, 这样将使衍射花样发生改变。这种变化示于图 8 之上, 沿纵坐标轴表示光强度, 横坐标轴表示距离。曲线 1 表

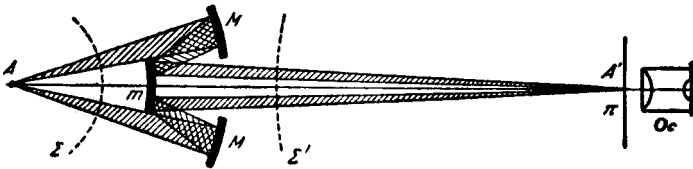


图 7

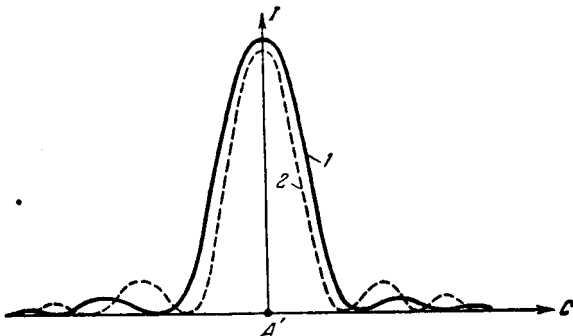


图 8

示与完整的波面 Σ' 对应的理想衍射花样(艾利圆),而曲线 2 则表示用不透明的圆屏遮盖波面 Σ' 的中央部分时所得到的衍射花样。

由图可见,光屏的存在导致中央亮斑变小,这是一个优点,但遗憾的是衍射环则大为增强。这对于强反衬的广延物体是有利的,但是,对于弱反衬的广延物体则具有相反的效果。为了在观察后一种物体,通常也就是最有趣的物体时避免过大的损失,光屏的面积不宜超过总面积的10%。如果不期望看到所得到的象显出比较强的衍射环,应当在显微镜反射物镜的结构中遵循这一规则。

§ 3. 当显微镜失调时发光点的象

直到现在,我们所研究的只是当显微镜调节得非常明锐时理想象的结构。但是,显微镜常常并非调节到理想象面上,而是调节到稍前或稍后于理想象面的某一个面上。在这种条件下所产生的衍射花样又将如何?

图 9 表示通过显微镜轴线 AA' 的任一个子午面内的情况。我们假设目镜调焦于平面 P 内的 A'' 点上,平面 P 与 A' 相距一个不大的距离 x 。由波面 Σ' 上不同的点所衍射的光振动不再同时会聚于 A'' 点,因为此点并非波面 Σ' 的球心。 A'' 点乃是球面 Σ_0 的中心。 Σ_0 面上各点与 Σ' 上诸点的距离为 Δ ,这一距离随着趋近于波面边缘而增大。由 M 点辐射的振动所经过的光程,较由 O 点辐射的振动的光程为大。此二光程的差值等于 Δ 。 Δ 数值称为由

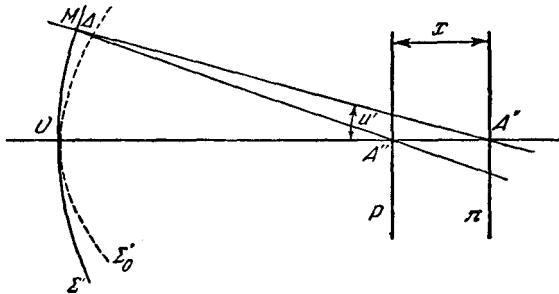


图 9

M 和 O 两点所发出的振动对 A'' 点的“程差”。我们以 Δ_m 表示与波面边缘对应的 Δ 的极大值。如果 $\Delta_m = 0$ ，则调焦面与理想象面重合，这种理想象的结构已经研究过了。对于不等于零的 Δ_m 的数值，调焦面不再与理想象面重合，衍射斑将发生如图10所示的变化。曲线1与理想的象(艾利圆)对应，曲线2则与存在某种焦移时衍射斑的结构相对应。中央亮斑的强度极大值降低了，圆环有显著的增强。衍射斑模糊不清。所得到的结果与中央部分被遮蔽时的变化有些类似，但具有附加的缺点，因为各暗环的最小值不再为零。广延物体象的衬度的普遍降低变得更加严重。如果调焦缺点十分严重，则衍射斑的结构完全改变。当 $\Delta_m = \lambda$ 时，在衍射图形中心有为零的最小值，所得到的曲线如图11所示。这一曲线表明衍射斑与正常情况有极大的差别。显然，当广延物体的象具有这种结构时，实际上已经不成其为象了。因此就不可能判清所研究的物体。当 Δ_m 为波长的整倍数 $2\lambda, 3\lambda, 4\lambda$ 等时，也将产生类似的现象。

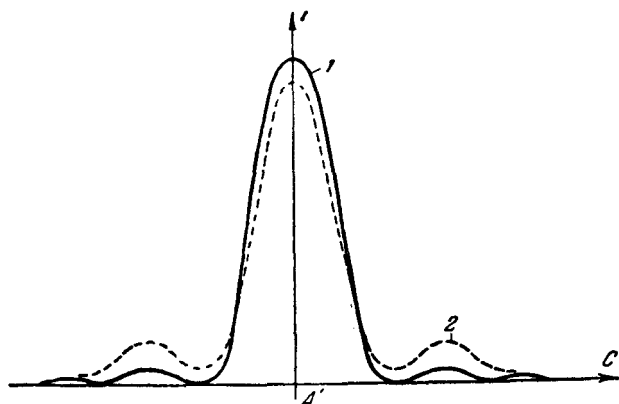


图 10

如果失调非常之小，则衍射斑的结构与理想象的结构很少有别。根据所谓“瑞利准则”，如果 Δ_m 不超过四分之一波长，即

$$\Delta_m \leq \frac{1}{4} \lambda$$