

迭 频 显 微 镜

谭维翰 王润文

(中国科学院上海光学精密机械研究所)

提 要

本文扼要的叙述了一种新的提高显微镜分辨本领的方法——迭频成像方法,并给出了低倍物镜与中倍物镜的实验结果。

一、引 言

在显微镜成像理论中,Abbe^[1]很早就提出二次成像的原理,他采用十分简明的光栅衍射的办法来陈述这一原理。虽然讨论时所采用的标本也是光栅,但已抓住问题的本质,与已有衍射理论对一般性标本讨论所得结果是一致的。从成像的数学理论来看,二次成像实质上就是二次傅氏变换,第一次变换是在物面上发生的,相当于对物体结构进行一次傅氏变换,于是光阑面上出现物体的衍射像,此后,又经一次变换(反傅氏变换)在光学系统的像面上再出现物体的像。如果在二次成像(变换与反变换)过程中,进行适当的安排便有可能将普通显微镜的分辨本领提高约一倍左右(两者是在相干照明下进行比较的)。本文介绍迭频显微镜之原理^[2],并给出了低倍物镜与中倍物镜的实验结果。实验结果分为光栅标本与一般标本的观察记录,其两种标本观察皆表明迭频系统能观察到更细的结构。

二、工作 原 理

为了简明与不妨碍问题的一般性讨论起见,我们仍采用光栅作为标本来说明这个问题。如图1所示,平面波 E 打在光栅 O 面发生衍射,分裂成若干束平行光束,其进行方向与入射波方向一致的称为零级衍射光谱,成像于物镜后焦面 O 点上;当其进行方向与入射方向夹角的正弦差乘以光栅间距 d 为一个波长 λ 者称为一级光谱,若为 $n\lambda$ 则称为 n 级,这些衍射级都聚焦在物镜后焦面上。假定平面波 E 是正投射在光栅面上,则在后焦面(或光阑面)上出现的衍射级为 $+N$ 到 $-N$ 共 $2N$ 个,光谱级数的多寡决定于成像物镜相对孔径的大小,孔径大则通过的级数多,反之,则通过的级数少。此后,这些衍射光谱在像面上干涉再现物体的像。至于像与原物体(标本)接近的程度也被这衍射光谱的数目所决定,换言之参与第二次干涉成像的光谱数愈多,像与原物体就愈加接近。那么,是否有可能使通过的衍射光谱级数增多呢?很明显,利用斜照明方法就能使通过的衍射级数增加一倍^[4]。

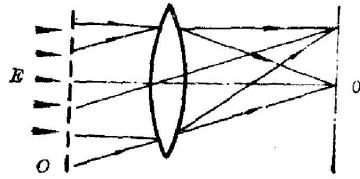


图 1 正照明情况下光栅的衍射级

Fig. 1 Diffraction orders of grating with normal illumination

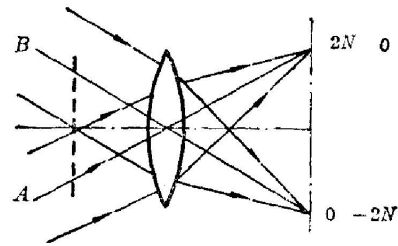


图 2 斜照明情况下光栅的衍射级

Fig. 2 Diffraction orders of grating with oblique illumination

如图 2 所示, A 斜照明光束产生由 $-2N$ 至 0 的各级光谱, 而 B 斜照明光束产生由 0 至 $2N$ 的各级光谱, 于是由 $-2N$ 至 $2N$ 范围内的衍射光谱都出现了, 这一情况比起同样条件下正照明情况出现的光谱 N 至 $-N$ 增加了一倍。因此初看起来成像品质也相应改好一倍, 可是由于 $-2N$ 至 $2N$ 内的衍射光谱在排列上的互相重迭, 因而第二次干涉成像时像面上就得不到由 $2N$ 至 $-2N$ (即 $4N$) 个光谱的效果。现在我们将上面由 AB 两光束的谱项 (0 至 $2N$ 与 $-2N$ 至 0) 在没有成像前重新排列一下, 如图 3 所示, 使它们不互相重迭, 而获得相当于相对孔径增大一倍的单束正照明光, 光谱数目也增大一倍, 所以选频系统也就相当于不变物镜的相对孔径而提高它的分辨本领的一倍。

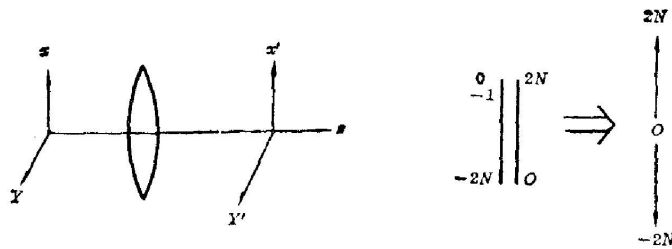


图 3 选频显微镜的衍射级

Fig. 3 Diffraction orders in the frequency-combined microscope

三、实验装置

实验装置如图 4 所示, 汞灯经聚光镜 L_1 后会聚在望远镜 L_2 的后焦面 S_1 上, 则 S_1 上每一点相应于光源共轭点, 它发出光线经 L_2 后变成平行光, 在光线到达狭缝 S_2 之前先经过起偏片 P_1 使它的振动方向与纸截面成 45° 方向。穿过狭缝 S_2 后又通过主光轴与光学系统光轴成 45° 的方解石 C_1 便分解成两束等强度的“ o ”光和“ e ”光, “ e ”光所走的是一条偏折了的路径, 穿出方解石后, 两条光线仍然平行, 但却有侧向移动。再让它们穿过水晶片 Q_1 使“ o ”光和“ e ”光偏振面都转过 90° , 于是各变为“ e ”光及“ o ”光了。这两束光就是所要采用照明的斜光束, 当它们穿过聚光镜——标本——物镜系统后两光上下位置交换, 然后穿过与 C_1 等厚度但光轴成垂直的方解石 C_2 , 穿出后中央迭合, 完成图 3 所示的过程, 从而做到谱项的正确排列^[5]。

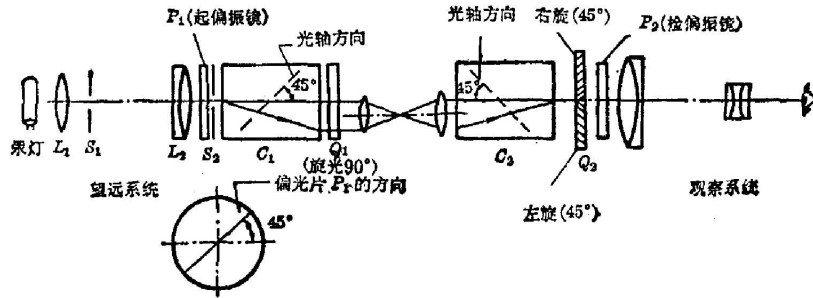


图 4 迭频显微镜装置

Fig. 4 Operation of frequency-combined microscope

但是为了两种光谱能起相干作用， Q_2 是左旋与右旋水晶构成的单元，它的交界面在光谱零级中央，这样“ o ”光光谱与“ e ”光光谱相等相反地旋转 45° ，因而振动面又在同一个平面上形成相干的光谱。另一方面，由于左、右旋光片的界线在零级中央，于是“ o ”光与“ e ”光的零级两个半面的电矢量朝相反方向旋转，形成了在上述光谱振动面垂直方向有一多余零级光谱的振动。检偏镜 P_2 的振动面允许光谱通过，而垂直方向的多余零级光谱则阻止通过。图 5 即表示这种作用，(a) 图表示“ o ”光光谱振动与“ e ”光光谱振动相等相反地旋转 45° 而在一个平面上；(b) 图表示两个迭合零级光谱左、右两半面所处的位置；(c) 图表示多余零级振动面与光谱振动面之关系，检偏镜 P_2 的振动面与前者是垂直的。

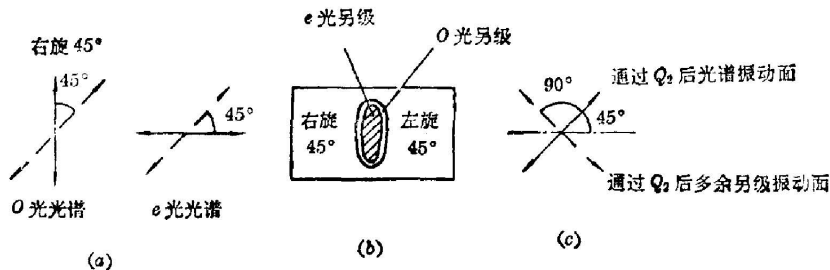


图 5 寻常光与非常光的偏振面

Fig. 5 Plane of polarization of ordinary wave and extraordinary wave

四、实验结果

我们仔细记录了 8 倍物镜 (N. A. 0.24) 及 20 倍物镜 (N. A. 0.45) 的实验结果，分别介绍如下：

1. 8 倍物镜的实验结果

实验分两步进行，首先我们把 $2.5\mu\text{m}$ 间隔的四条平行透光刻线用 8 倍镜头 (N. A. 0.24) 在各种照明系统下进行照相，并用微光度计自动记录它们的透过率曲线，在迭频系统下透过率变化最大，8 倍迭频系统 (图 6(a)1) 可与 $24\times$ (N. A. 0.42) 在普通显微镜下照相的透过率曲线 (图 6(b)1) 相比。图 6(a) 2 为无迭频时双光束斜照系统透过率曲线，图 6(b) 2 为普通显微镜 $8\times$ (N. A. 0.24) 透过率曲线。第二步我们取去上面标本，插上文昌鱼标本，

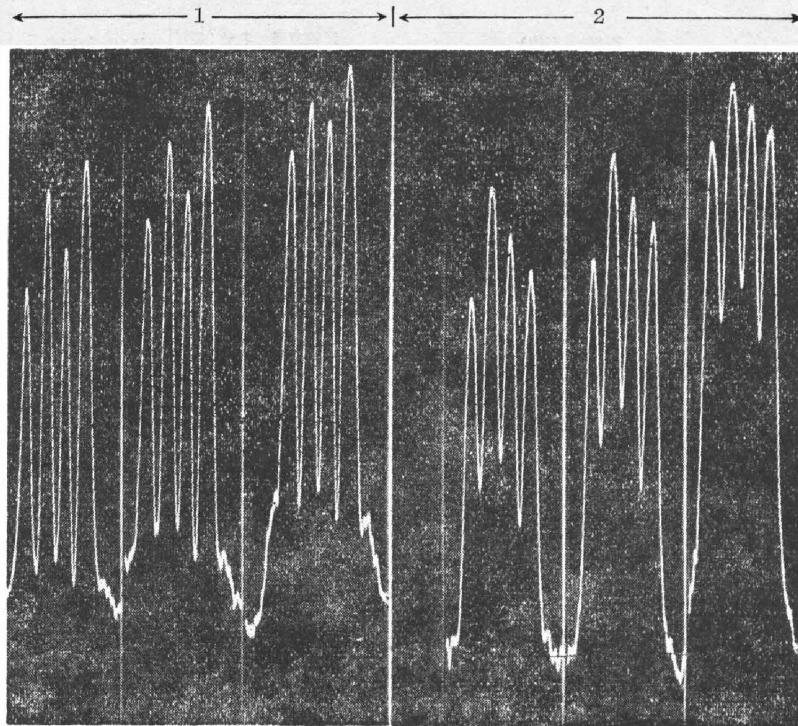


图 6(a) 1. 选频系统透过率曲线; 2. 双光束斜照明系统透过率曲线

Fig. 6 (a) 1. Transmission with frequency-combined system 2. Transmission with two beam oblique illumination

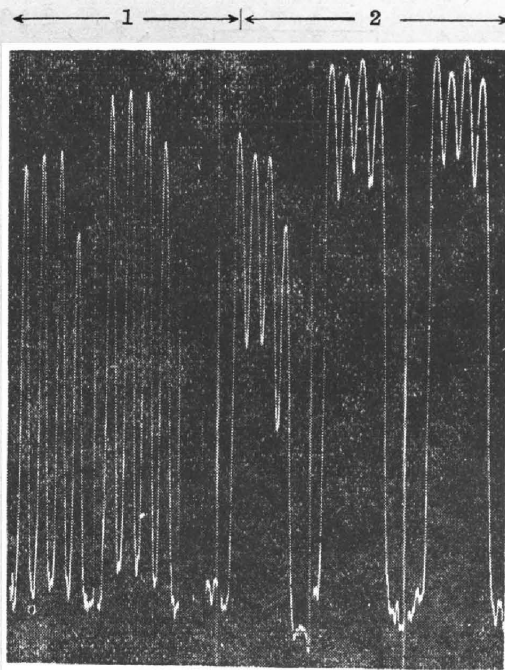


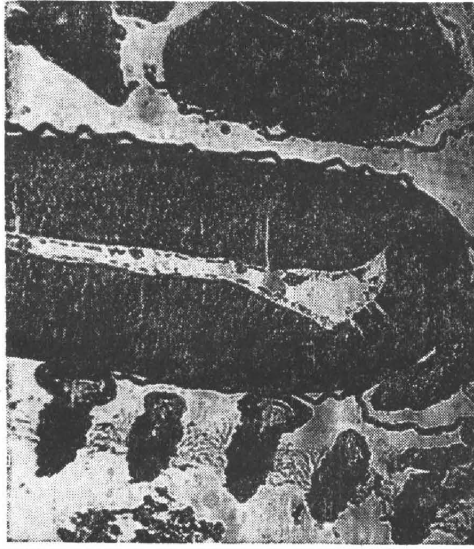
图 6(b) 1. 普通显微镜 24× (N. A. 0.42) 透过率曲线;
2. 普通显微镜 8× (N. A. 0.24) 透过率曲线

Fig. 6 (b) 1. Transmission with conventional 24× (N. A. 0.42) objective;
2. Transmission with conventional 8× (N. A. 0.24) objective

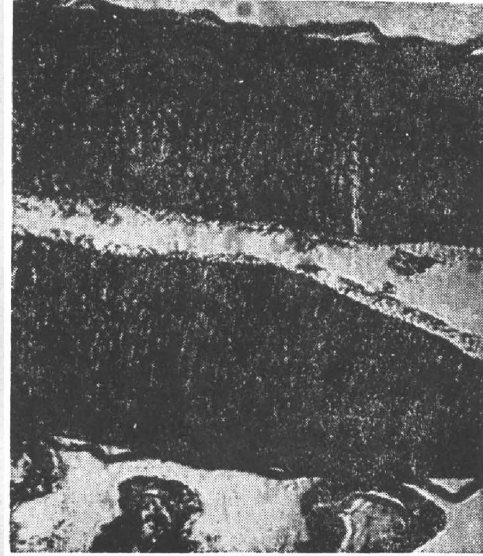
观察其神经索部分,如图7所示。8倍迭频系统的观察(图7(c))比起同样镜头的普通显微镜观察(图7(a))有更细的结构,诚然它尚有一种独特的浮雕感,与 Zernike 位相观察不很一致。

2. 20倍物镜的实验结果

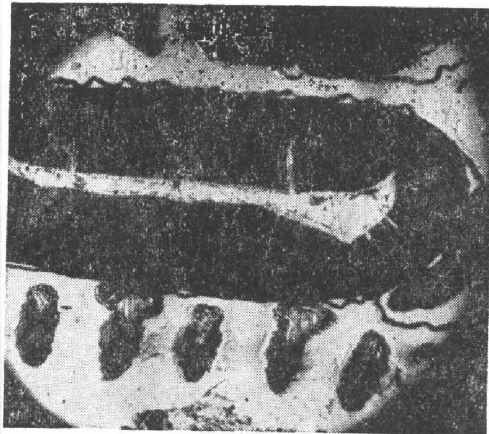
实验亦是分两步进行,但在进行光栅标本实验时应考虑到与普通显微镜在不同聚光镜孔径照明下的观察的比较。因为按 Hopkins^[3]的计算,普通显微镜的分辨能力除决定于物



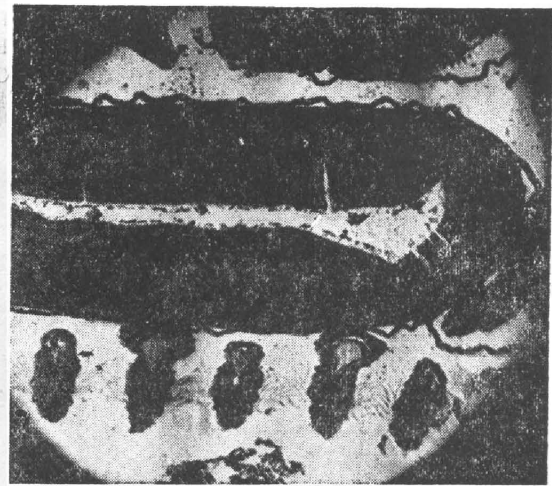
(a) 普通显微镜 8× (N. A. 0.24) 照相
(a) Photo taken with 8× (N. A. 0.24)
conventional microscope objective



(b) 普通显微镜 24× (N. A. 0.42) 照相
(b) Photo taken with 24× (N. A. 0.42)
conventional microscope objective



(c) 迭频系统 8× (N. A. 0.24) 照相
(c) Photo taken with 8× (N. A. 0.24)
frequency-combined system



(d) 双光束斜照明 8× (N. A. 0.24) 照相
(d) Photo taken with 8× (N. A. 0.24)
with two oblique beam illumination

图7 文昌鱼标本的各种观察结果

Fig. 7 Observation from lancelet

镜的数值孔径外,还决定于聚光系统的数值孔径的大小。Hopkins 的计算指出:聚光镜孔径为物镜数值孔径 1.4~1.5 倍时,分辨能力最高。图 8 是线间距 1 微米的四条平行透光刻线用 20 倍 (N. A. 0.45) 物镜、聚光镜孔径为 N. A.=0.16, 0.45, 1.0, 1.4 的普通显微镜及迭频显微镜的光栅像与透过率曲线图。图 9 是 20 倍 (N. A. 0.45) 迭频显微镜的光栅像和透过率曲线图与普通显微镜 20 倍及 45 倍物镜观察相当图形之比较。可以看出迭频系统 20 倍 (N. A. 0.45) 比同样镜头的普通显微镜分辨本领高,并与普通显微镜 45 倍 (N. A. 0.65) 的分辨能力相当。

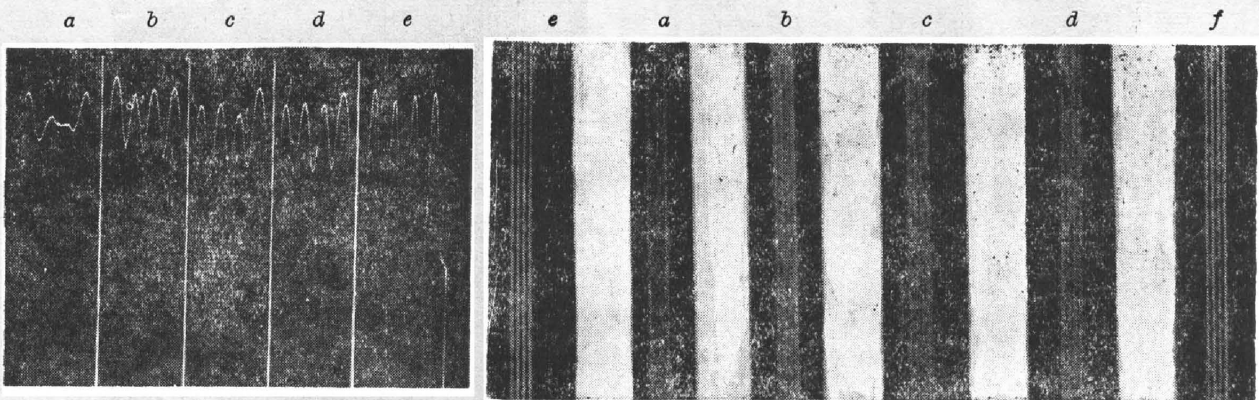


图 8. 20 倍物镜在各种照明孔径下的光栅像(右图)及其透过曲线(左图)

Fig. 8 Grating images(right) and their transmisson (left) from 20× (N. A. 0.45) objective for different illumination apertures(grating separation 1μ)

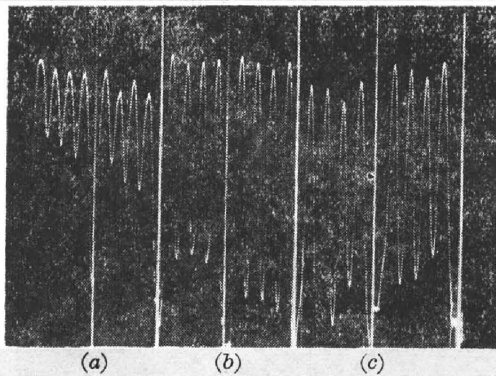


图 9 20 倍与 45 倍物镜的比较(光栅间距 1μ)

- (a) 20 倍普通显微镜光栅像及透过率曲线
- (b) 20 倍迭频系统的光栅像及透过曲线
- (c) 45 倍普通显微镜光栅像及透过率曲线

Fig. 9 Conventional 20× and 45× objective with grating separating 1μ

- (a) Photo taken with conventional microscope 20× (N. A. 0.45)
- (b) Photo taken with frequency-combination system 20× (N. A. 0.45)
- (c) Photo taken with conventional microscope 45× (N. A. 0.65)

- (a) 照明系统孔径 0.16 (b) 照明系统孔径 0.45
- (c) 照明系统孔径 1.0 (d) 照明系统孔径 1.4
- (e) 迭频系统 20× (N. A. 0.45) (f) 普通显微镜 45× (N. A. 0.65)
- (a) Illumination aperture 0.16 (b) Illumination aperture 0.45
- (c) Illumination aperture 1.0 (d) Illumination aperture 1.4
- (e) Frequency-combination system 20× (N. A. 0.45)
- (f) Conventional microscope 45× (N. A. 0.65)

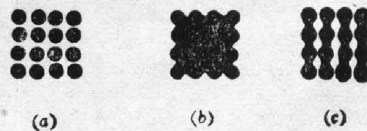


图 10

- (a) 用 45 倍观察全分辨
- (b) 用 20 倍观察不可分辨
- (c) 用迭频系统 20 倍观察, 一维分辨

Fig. 10 (a) With 45× objective completely resolvable
(b) With 20× objective unresolvable
(c) With 20× objective frequency-combined system resolvable in one dimension only

在对点状标本观察时,由于目前迭频像的高分辨方向是一维的,因而若标本是等距离分布的点子(如图 10(a)所示),并在普通显微镜观察下 20 倍物镜不能分辨而 45 倍却能分辨。则 20 倍所成的像为模糊像,45 倍为点状的清晰像,而迭频像却必然形成条形像,这从以下硅藻标本实验结果中亦可看到。

图 11 为各种观察下的硅藻标本像,可以看出迭频像有较高的分辨能力,与 45 倍相比显然还有浮雕感觉,但亦与 Zernike 相位观察不一致。

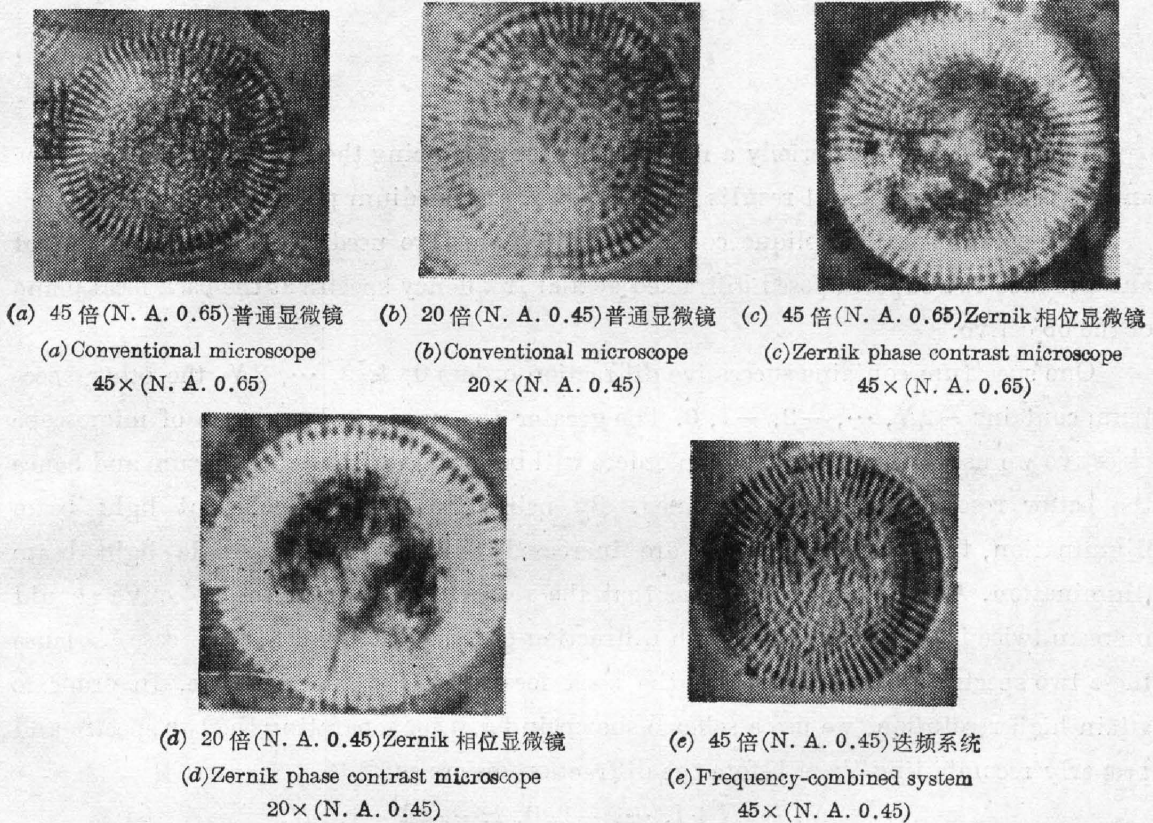


图 11 硅藻标本的各种观察像

Fig. 11 Observation from diatom

参加这一工作的还有姜贞子同志和郑学传同志,谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] M. Born, E. Wolf; *Principles of Optics* (Oxford, Pergamon Press., 1975), 418.
- [2] 谭维翰;《中国科学院长春光学精密机械研究所集刊》,第三集(1963), 25.
- [3] H. H. Hopkins, P. M. Bacham; *Proc. Phys. Soc.*, 1950. **63**, No. 1, (Jan), 72.
- [4] 谭维翰,王润文;《中国科学院长春光学精密机械研究所集刊》,《第三集(1963)》, 40.
- [5] 王润文;《中国科学院长春光学精密机械研究所集刊》,第三集(1963), 62.

A frequency-combined microscope

TAN WEIHAN AND WANG RUMWEN

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

(Received 10 July 1980)

Abstract

This paper describes briefly a new concept for enhancing the resolution of microscope and gives the experimental results for low power and medium power objectives.

Two symmetrically oblique coherent light beams are used to illuminate an object and produce two superimposed diffracted spatial frequency spectra at the back focal plane of the objective.

One spectrum contains successive diffraction orders $0, 1, 2, \dots, 2N$, the other spectrum contains $-2N, \dots, -2, -1, 0$. The greater the numerical aperture of microscope objective we use, the more diffraction orders will be contained in each spectrum and hence the better resolution will be obtained. By using two oblique coherent light beam illumination, the diffraction orders are increased twice as in the single light beam illumination. At first glance, it seems that the resolving power of the objective should increase twice in correspondence with diffraction orders. But this isn't the case, because these two spectra are overlapped at the back focal plane of the objective. In order to attain high resolution, we use a scheme shown in fig. 4 for separating the two spectra and properly recombining them before the diffraction orders as

$$-2N, -2N+1, \dots, -1, 0, 1, \dots, 2N-1, 2N,$$

instead of superposition

$$\begin{aligned} & -2N, -2N+1, \dots, -1, 0 \\ & 0, 1, \dots, 2N-1, 2N. \end{aligned}$$

In experiments we observed specimens such as grating, lancet or diatom with objectives $8\times$ (N. A. 0.24) or $20\times$ (N. A. 0.45). By analyzing the microscopic picture taken at different conditions, we conclude that the frequency-combined microscope is superior to the conventional one in resolving power, whether using oblique illumination or not, and it can reveal finer textures of such specimens as lancet and diatom mentioned above and achieve a high contrast in intensity in the case of a grating.