

相衬显微镜中的部分相干光成像

马长明 程维明

(上海机械学院)

庄松林

(上海光学仪器研究所)

提 要

本文根据部分相干光成像的理论, 分析了光源的空间相干性及时间相干性对相衬显微镜成像质量的影响, 并对相衬环同光源的形状及大小的匹配问题进行了讨论。结果表明, 部分相干光照明将引起位相物体像的对比度下降。由于相衬环在一定程度上改变了非零频谱的特性, 因此像面上的光强分布亦有所改变。如果对照明条件及滤波方式进行一些改进, 相衬显微镜的成像质量将会得到改善。

一、关于光源空间相干性的讨论

相衬显微镜的结构简化为图 1, 透镜 L_1 把其前焦面上的环状准单色面光源成平行光投射到物面上, 相位物体经透镜 L_2 、 L_3 成像在像面上, 相衬环(滤波函数)放置在透镜 L_3 的后焦面上。

设光源的光强分布为

$$I_0(x_0, y_0) = \begin{cases} I_0 & a \leq \sqrt{x_0^2 + y_0^2} \leq b \\ 0 & \sqrt{x^2 + y^2} > a, < b. \end{cases} \quad (1)$$

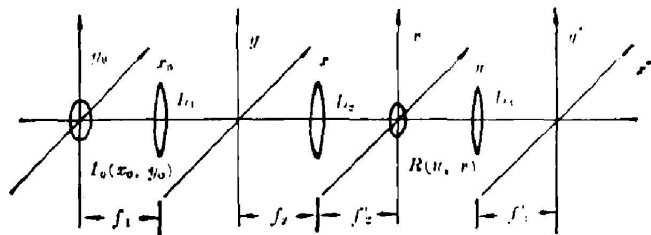


Fig. 1 Schematic of a phase-contrast microscope

在这样一个准单色扩展光源照明下, 物面上两点间的互强度可表示为

$$J^{-1}(x_1 - x_2, y_1 - y_2) = \frac{I_0}{\left(1 - \frac{a^2}{b^2}\right)^2} \left[\frac{2J_1(w_b)}{w_b} - \frac{a^2}{b^2} \frac{2J_1(w_a)}{w_a} \right]^2 \exp \left[\frac{2\pi i}{\lambda} (x_1^2 - x_2^2 + y_1^2 - y_2^2) / 2f_1 \right], \quad (2)$$

式中 $J_1(x)$ 为一阶贝塞尔函数, 而

$$w_b = \frac{2\pi b}{\lambda f_1} \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}, \quad w_a = \frac{2\pi a}{\lambda f_1} \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}.$$

当满足物面上两点 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 到光源平面原点的距离之差很小时, 相位因子可忽略。

设物之透射函数为 $f(x, y)$, 从物面透射后的互强度为

$$J(x_1, y_1, x_2, y_2) = J^{-1}(x_1 - x_2, y_1 - y_2) f(x_1 y_1) f^*(x_2 y_2), \quad (3)$$

其频谱则为

$$\mathcal{J}(u_1, v_1, u_2, v_2) = \mathcal{J}^{-1}(u_1, v_1, u_2, v_2) \otimes [\mathcal{F}(u_1, v_1) \mathcal{F}^*(-u_2, -v_2)]. \quad (4)$$

如果考虑等晕成像, 通过系统后的互强度就是

$$\begin{aligned} J'(x'_1, y'_1, x'_2, y'_2) \\ = \iiint_{-\infty}^{\infty} J(x_1, y_1, x_2, y_2) T(x'_1 - x_1, y'_1 - y_1) T^*(x'_2 - x_2, y'_2 - y_2) dx_1 dy_1 dx_2 dy_2, \end{aligned} \quad (5)$$

其中 $T(x, y)$ 为系统的透射函数, 根据卷积定理, 得到像的频谱为

$$\mathcal{J}'(u_1, v_1, u_2, v_2) = \mathcal{J}(u_1, v_1, u_2, v_2) \mu(u_1, v_1, u_2, v_2), \quad (6)$$

μ 为系统透射函数谱, 它与光瞳函数 $G(u, v)$ 具有简单的关系

$$\mu(u_1, v_1, u_2, v_2) = G(u_1, v_1) G^*(-u_2, -v_2). \quad (7)$$

设滤波函数为 $R(u, v)$, 于是滤波后的像谱为

$$\mathcal{J}''(u_1, v_1, u_2, v_2) = \mathcal{J}'(u_1, v_1, u_2, v_2) R(u_1, v_1) R^*(u_2, v_2), \quad (8)$$

再做一次变换, 即得像面上的互强度

$$\begin{aligned} J''(x'_1, y'_1, x'_2, y'_2) \\ = \iiint_{-\infty}^{\infty} \mathcal{J}''(u_1, v_1, u_2, v_2) \exp[2\pi i(u_1 x'_1 + v_1 y'_1 + u_2 x'_2 + v_2 y'_2)] du_1 dv_1 du_2 dv_2. \end{aligned} \quad (9)$$

如果光瞳足够大, 物谱能全部(或基本上全部)通过整个系统, 并且认为是理想成像的条件下, 光瞳函数 $G(u, v)$ 可作常数处理。实际的相衬环是一个与光源像相匹配(一般可能稍大些)的介质圆环, 其函数形式为 $R(u, v) = itI_0(u, v)$, t 表示相衬环的透射率。设相位物体的相位变化很小, 这样可写出

$$f(x, y) = \exp[i\phi(x, y)] \doteq 1 + i\phi(x, y), \quad (10)$$

其频谱则为

$$\mathcal{F}(u, v) = \delta(u, v) + i\Phi(u, v). \quad (11)$$

若 $f(x, y)$ 的频谱, 除零级以外均未受到相衬环的遮拦, 则可得出

$$\begin{aligned} J''(x'_1, y'_1, x'_2, y'_2) &= \iiint_{-\infty}^{\infty} \{ \mathcal{J}^{-1}(u_1, v_1, u_2, v_2) * [\mathcal{F}(u_1, v_1) \mathcal{F}^*(-u_2, -v_2)] \} \\ &\quad \times R(u_1, v_1) R^*(u_2, v_2) \} \exp[2\pi i(x'_1 u_1 + y'_1 v_1 + x'_2 u_2 + y'_2 v_2)] \\ &= \iiint_{-\infty}^{\infty} \mathcal{J}^{-1}(u_1, v_1, u_2, v_2) \otimes \{ [t\delta(u_1, v_1) + \Phi(u_1, v_1)] [t\delta(-u_2, -v_2) \\ &\quad + \Phi(-u_2, -v_2)] \} \exp[2\pi i(u_1 x'_1 + v_1 y'_1 + u_2 x'_2 + v_2 y'_2)] du_1 dv_1 du_2 dv_2 \\ &= \frac{I_0}{\left(1 + \frac{a^2}{b^2}\right)^2} \left[\frac{2J_1(w'_b)}{w'_b} - \frac{a^2}{b^2} \frac{2J_1(w'_a)}{w'_a} \right]^2 \{ [t + \phi(x'_1, y'_1)] \\ &\quad \times [t + \phi(x'_2, y'_2)] \}, \end{aligned} \quad (12)$$

式中 $w'_b = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{f_2 b}{f_1 f_3} \sqrt{(x'_1 - x'_2)^2 + (y'_1 - y'_2)^2}$, $w'_a = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{f_2 a}{f_1 f_3} \sqrt{(x'_1 - x'_2)^2 + (y'_1 - y'_2)^2}$, 于是

可求出像面上的光强分布为

$$I(x', y') = J''(x'_1, y'_1, x'_2, y'_2) \Big|_{\substack{x'_1=x'_2=x' \\ y'_1=y'_2=y'}} = I_0[t + \phi(x', y')]^2, \quad (13)$$

忽略高阶小量, 就有

$$I(x', y') = I_0(t^2 + 2t\phi(x', y')). \quad (14)$$

可见, 在准单色扩展光源的照明下, 照明和系统的联合效应同物的作用是分开的。当均匀照明, 并且是理想成像的条件下, 如果相衬环未改变非零频谱, 则像的光强分布与物的相位分布成正比, 像的对比度亦与相干照明条件下推出的结果相一致。然而一般相位物体的频谱是连续的, 而相衬环又具有一定的面积, 它除了作用于零级频谱外, 还使附近一些非零频谱受到遮拦。这些频谱的光在像面上形成的光强分布将不再正比于物体之相位分布, 而是形成背景光强, 使像的对比度下降, 同时像的光强分布也因失掉了这些频谱成分而发生改变。

设物谱被分为受到遮拦的 $\Phi'(u, v)$ 和未受到遮拦的 $\Phi''(u, v)$ 两部分, 即

$$\mathcal{F}(u, v) = \delta(u, v) + i[\Phi'(u, v) + \Phi''(u, v)], \quad (15)$$

这时得到的像面上的光强分布为

$$\begin{aligned} I(x', y') &= I_0 \left| \iint_{-\infty}^{\infty} [it\delta(u, v) - t\Phi'(u, v) + i\Phi''(u, v)] \exp[2\pi i(ux' + vy')] du dv \right|^2 \\ &= I_0 \{ [t + \phi'_e(x', y') - t\phi'_o(x', y')]^2 + [\phi''_e(x', y') + t\phi''_o(x', y')]^2 \} \\ &= I_0 \{ t^2 + 2t[\phi''_e(x', y') - t\phi''_o(x', y')] + [\phi''_e(x', y') - t\phi''_o(x', y')]^2 \\ &\quad + [\phi'_o(x', y') + t\phi'_e(x', y')]^2 \}, \end{aligned} \quad (16)$$

式中 $\phi'_e(x', y')$ 及 $\phi'_o(x', y')$ 分别表示 $\Phi(u, v)$ 的偶部与奇部的傅氏变换。考虑 $\phi'_e(x', y')$ 、 $\phi'_o(x', y')$ 、 $\phi''_e(x', y')$ 和 $\phi''_o(x', y')$ 都是很小的量, 并且 t 也很小(一般取为 0.1~0.01), 忽略高阶小量, 则

$$I(x', y') = I_0[t^2 + 2t\phi''_e(x', y')]. \quad (17)$$

像的光强分布显然发生了改变, 一般说来, 这种改变主要表现为对比反转, 因为相衬环首先遮拦的将是零级附近的频谱。此外, 当含有大部分能量的低级频谱被遮拦而发生衰减后, 即使不出现明显的对比反转, 也会因构成像的光强分布的有效频谱的能量太低, 以至于同背景干扰混在一起而无法辨清。下面通过一个具体的显微镜系统来考察相衬环的遮拦所带来的影响。

仍取图 1 中的结构, 取物镜 L_2 、 L_3 的焦距分别为 6 mm 和 150 mm, 相衬环与光源像的大小一致, 环内半径 R_1 为 1 mm, 外半径 R_2 为 1.5 mm。设透射物体的相位呈正弦分布, 即

$$f(x, y) = \exp[i\epsilon \sin 2\pi u_0 x], \quad (18)$$

其频谱为

$$\mathcal{F}(u, v) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} J_m(\epsilon) \delta(u - mu_0) \delta(v), \quad (19)$$

式中 $J_m(x)$ 为 m 阶贝塞尔函数。由于 ϵ 值很小, 所以光能量主要集中在低频部分(见表 1), 这时可把上述的傅氏变换对简化为

$$\begin{cases} f(x, y) \doteq 1 + i\epsilon \sin 2\pi u_0 x, \\ \mathcal{F}(u, v) \doteq \delta(u, v) + \frac{i\epsilon}{2} [\delta(u - u_0, v) + \delta(u + u_0, v)]. \end{cases} \quad (20)$$

Table 1

m	0	1	2	3	4	5	6
$J_m^2(0, 1)$	0.995	4.98×10^{-3}	3.12×10^{-6}	8.68×10^{-10}	1.36×10^{-13}	1.36×10^{-17}	9.42×10^{-22}

在环状扩展光源照明下, 谱面上的光强分布为光源像(忽略衍射效应)与 $|\mathcal{F}(u, v)|^2$ 的卷积。如果相位光栅的空间频率较低, 则被相衬环遮拦的那部分有效频谱的能量较多(见图 2), 若被遮拦的能量占到总能量的 90% 以上, 像的光强分布将会发生明显的改变。根据面积积分, 可求出被遮拦的能量与总能量(不包括零级及 2 级以上频谱的能量)的比值曲线, 如图 3 所示。当空间频率低于 100/mm 时, 参加成像的有效频谱的能量已少于 10%。

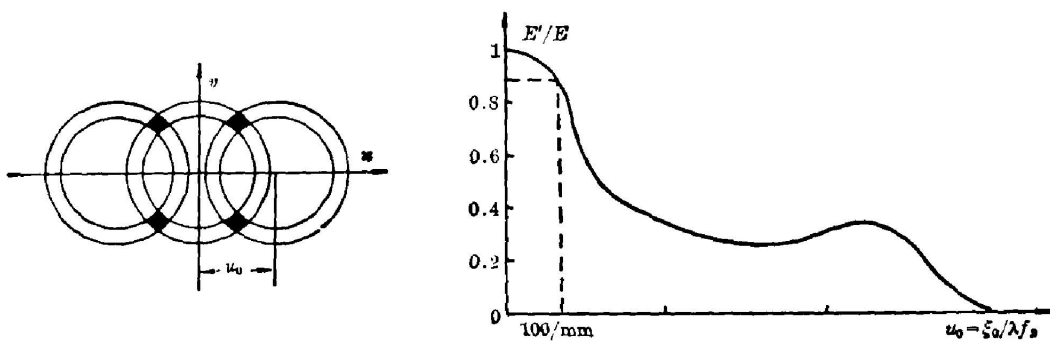


Fig. 2 Two first-order spectra of a phase grating covered by a phase plate

Fig. 3 Ratio of the energy of the effective spectra covered by a phase plate to energy of the total effective spectra

对于非周期的相位分布, 亦有类似的结论。图 4 为根据电子计算机数值计算所得到的不同边长的正方形相位物体的像的光强分布曲线, 为了便于比较, 在强度坐标及位置坐标上使用了相对值, 并且除去了背景光强。显然当边长 s 为 0.006 mm 时, 像的中心光强下降了 90%, 已出现了明显的对比反转。此时看到的已不是一个正方形的光斑, 而可视为一个光环! 这种效应在实际的相衬显微镜中可以容易地看到, 对于较大的物体图形, 其像的边缘会变得更亮(亮相衬)或更暗(暗相衬), 即出现轮廓突出的现象。

图 5 画出了相同的相位物体在相衬环取不同的环宽度时的像的光强分布。随着环宽度

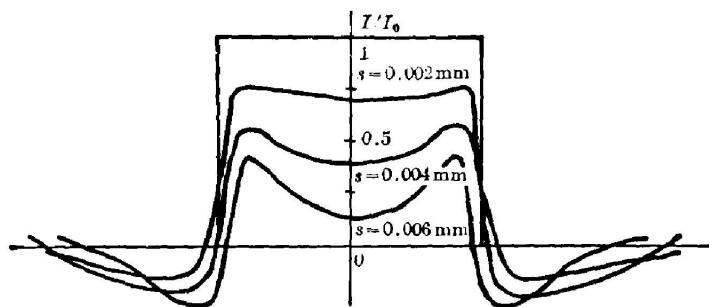


Fig. 4 Image intensity curves of squares with different sizes, $R_1=1 \text{ mm}$, $R_2=1.5 \text{ mm}$

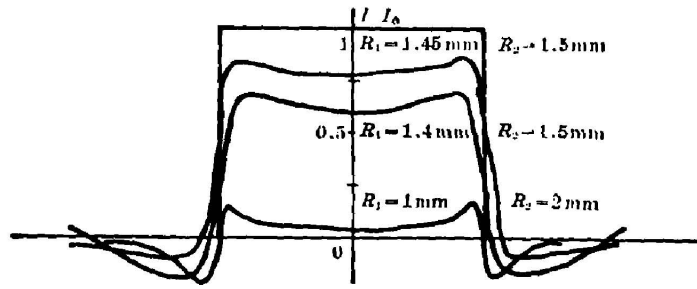


Fig. 5 Image intensity curves of a square with $S=0.012$ mm, while R_1 and R_2 having different values

的增加, 遮栏作用变强, 相位物体的像的对比反转越明显。可见, 减少相衬环的宽度是提高相衬显微镜成像质量的一个有效办法。

二、关于光源时间相干性的讨论

在普通的相衬显微镜中, 照明光的光谱宽度可通过滤色片限制到数百埃。相衬环的镀膜仅能对某一特定波长的光产生 $\pi/2$ 的相位移动。而偏离此波长的光则不是 $\pi/2$ 的相位移动。所有这些波长的光的综合作用将使像的背景亮度增加, 对比度下降, 下降的幅度与照明光的光谱宽度及其相位偏移量中值波长同特定波长的偏离程度有关。

设光源为复色点光源, 即其光谱宽度为 $2\Delta\lambda$, 面积趋于零, 其中某一波长的光在像面上的贡献为

$$\begin{aligned} dI(x', y') &= \left| \iint_{-\infty}^{\infty} [t \exp(id)s(u, v) + i\Phi(u, v)] \exp[2\pi i(ux' + vy')] du dv \right|^2 dI_\lambda \\ &= |t \exp(i\alpha) + i\phi(x', y')|^2 dI_\lambda \\ &= [t^2 + 2t \sin 2\phi(x', y') + \phi^2(x', y')] dI_\lambda, \end{aligned} \quad (21)$$

式中 $\alpha = \frac{2\pi}{\lambda}(n-1)b$ 为该波长光的相位移动, n 为该波长光在相衬环镀膜介质中的折射率, b 为膜的厚度。忽略高阶小量, 得

$$dI(x', y') = [t^2 + 2t \sin \alpha \phi(x', y')] dI_\lambda. \quad (22)$$

设照明光整个光谱宽度对应的相位移动范围为 $2\Delta\alpha_1$, 则

$$2\Delta\alpha_1 = 2\pi b \left(\frac{n_m}{\lambda_m} - \frac{1}{\lambda_m} - \frac{n_M}{\lambda_M} + \frac{1}{\lambda_M} \right), \quad (23)$$

λ_M 、 λ_m 分别表示光谱宽度的上限波长与下限波长。偏移量的中值相对于特定波长的相位移动量的差值为

$$\Delta\alpha_2 = \pi b \left(\frac{n_m}{\lambda_m} - \frac{1}{\lambda_m} + \frac{n_M}{\lambda_M} - \frac{1}{\lambda_M} \right) - \frac{\pi}{2}. \quad (24)$$

如果在 $2\Delta\alpha_1$ 内视光强为均匀分布, 则

$$dI_\lambda = \frac{I_0}{2\Delta\alpha_1} d\alpha, \quad (25)$$

把(25)式代入(22)式进行积分,得到像面上总的光强分布为

$$\begin{aligned}
 I(x', y') &= \frac{I_0}{2\Delta\alpha_1} \int_{\frac{\pi}{2} + \Delta\alpha_1 + \Delta\alpha_2}^{\frac{\pi}{2} + \Delta\alpha_1 + \Delta\alpha_2} [t^2 + 2t \sin \alpha \phi(x', y')] d\alpha \\
 &= \frac{I_0}{2\Delta\alpha_1} \left\{ 2t^2 \Delta\alpha_1 + 2t \phi(x', y') \left[\cos \left(\frac{\pi}{2} + \Delta\alpha_2 - \Delta\alpha_1 \right) - \cos \left(\frac{\pi}{2} + \Delta\alpha_2 + \Delta\alpha_1 \right) \right] \right\} \\
 &= I_0 \left[t^2 + 2t \phi(x', y') \frac{\sin \Delta\alpha_1}{\Delta\alpha_1} \cos \Delta\alpha_2 \right]. \tag{26}
 \end{aligned}$$

像的对比度则是

$$M = \frac{I(x', y') - I_0 t^2}{I_0 t^2} = \frac{2}{t} \phi(x', y') \frac{\sin \Delta\alpha_1}{\Delta\alpha_1} \cos \Delta\alpha_2. \tag{27}$$

讨论:

(1) $\Delta\alpha_1 = \Delta\alpha_2 = 0$, 则 $M = \frac{2}{t} \phi(x', y')$ 。这是以单色光照明, 并且照明光波长与镀膜时取的特定波长相一致时的情况, 像的对比度最好;

(2) $\Delta\alpha_1 = 0, \Delta\alpha_2 \neq 0, M = \frac{2}{t} \phi(x', y') \cos \Delta\alpha_2$ 。这是以单色光照明, 但其波长与特定波长不相一致时的情况。对比度随着 $\Delta\alpha_2$ 的增加而下降, 当 $\Delta\alpha_2 = \frac{\pi}{2}$ 时, 对比度为零, 相衬效果完全消失(见图6);

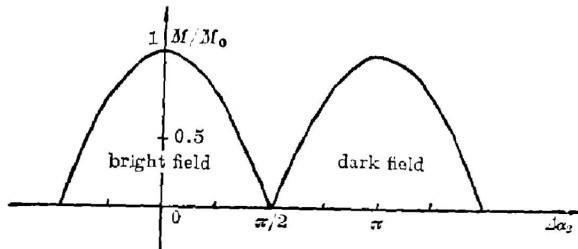


Fig. 6 Contrast curve when the wavelength of the illuminating light is not equal to the special wavelength

结果完全消失(见图6);

(3) $\Delta\alpha_2 = 0, \Delta\alpha_1 \neq 0, M = \frac{2}{t} \phi(x', y') \frac{\sin \Delta\alpha_1}{\Delta\alpha_1}$ 。此时照明光有一定的波长宽度, 但其相移动量中值恰为 $\pi/2$, 对比度随 $\Delta\alpha_1$ 增大而下降, 但效果不及 $\Delta\alpha_2$ 明显, $\Delta\alpha_1 = \pi$ 时, 对比度下降至零(见图7);

(4) $\Delta\alpha_1$ 与 $\Delta\alpha_2$ 均不为零, 对比度下降最明显, 这亦正是普通相衬显微镜的工作状态。由此可知, 要提高相衬显微镜的成像质量, 有效的措施就是减小照明光的光谱宽度, 并使相移动量中值等于 $\pi/2$ 。一般说来, 在 $2\Delta\alpha_1$ 范围内光能量并非均匀分布, 因为滤色片对偏离其中心波长的光的透射率是下降的, 所以实际像的对比度可能稍好些。

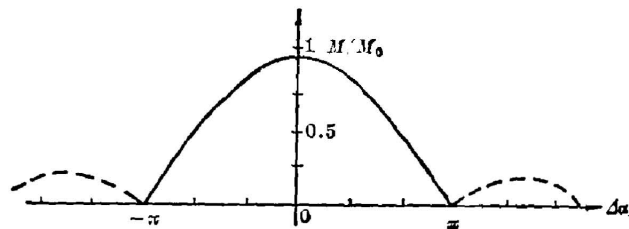


Fig. 7 Contrast curve for $\Delta\alpha_2 = 0, \Delta\alpha_1 \neq 0$

三、结 束 语

相衬显微镜中采用部分相干光照明将引起像的对比度下降, 其中一个主要因素是由于照明光具有一定的光谱宽度或者其相位移动量中值不是 $\pi/2$ 。因此从光源的时间相干性出发, 应该减小光谱宽度。从光源的空间相干性出发, 由于谱面上的零级频谱并非是一个点脉冲分布, 而是一个由光瞳尺寸所决定的衍射分布函数与光源像的卷积, 因此相衬环的形状及大小应与这个卷积像相匹配。但是因相衬环有了一定的面积, 就使一部分低级频谱受到遮拦而衰减并发生 $\pi/2$ 的相位移动, 从而使像的光强分布发生了变化。这是影响像对比度的另一主要因素, 解决它的一个办法就是减小光源面积, 从而使相衬环面积减小。

针对上述主要因素, 可采用一些切实可行的办法来消除它们对成像质量的影响。如采用单色光源或使用窄带滤色片, 并在使用中尽可能使滤色片的中心波长与相衬环的特定波长相一致(中心波长的光能量透射最多)。在不降低像面亮度的前提下, 设法改变光源以及与之相匹配的相衬环的形状, 如采用多环形式以便减少每个环的宽度, 或者采用许多点光源构成的编码光源以及与之相匹配的滤波函数, 均可以减少对低级频谱的遮拦, 从而使像对比度得到提高。

总之, 相衬显微镜中采用部分相干光照明, 其像的对比度是低于由相干照明条件下推导出的理论结果的。如果对照明条件及滤波方式加以适当改进, 将会提高相衬显微镜的成像质量, 这些尚需要今后作进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 庄松林, 钱振邦编著;《光学传递函数》, (机械工业出版社, 1981), 156。
- [2] M. 玻恩, E. 沃耳夫著;《光学原理》(上、下册), (科学出版社, 1978~1981), 648。
- [3] 麦伟麟著;《光学传递函数及其数理基础》, (国防工业出版社, 1979), 244。
- [4] J. W. 顾德门著;《傅里叶光学导论》, (科学出版社, 1976), 64。

Imaging of phase contrast microscopes under partially coherent illumination

MA CHANMING AND CHEN WEIMING

(Shanghai Institute of Mechanics)

ZHUANG SONGLIN

(Shanghai Institute of Optical Instrumentation)

(Received 8 January 1985)

Abstract

Effects of either spatially or temporally partial coherence on the image quality of a microscope are considered in this paper. Calculation results indicate that under partially coherent illumination the image contrast will be lower than that under coherent illumination, but it can be improved by utilizing a carefully designed light source and a special spatial filter.