

## 5-02 阿贝成像原理与相衬显微镜

1.阿贝 ( E. Abbe ) 成像原理

2 空间滤波的概念

3 阿贝—Porter空间滤波实验

4 相衬显微镜 ( F. Zernike, 泽尼克, 1935 Nobel Laureate )

# 1. 阿贝 ( E. Abbe ) 成像原理

- 对于衍射屏，可以用Fourier变换将其展开为Fourier级数或Fourier积分

$$t(x) = t_0 + \sum_{n \neq 0} \tilde{t}_n e^{i2\pi f_n x} = \sum_{-\infty}^{+\infty} \tilde{t}_n e^{i2\pi f_n x}$$

$$\tilde{t}_n = \frac{1}{d} \int_{-d/2}^{d/2} t(x) e^{-2i\pi f_n x} dx$$

$$f_n = n f_1 = n f = n \frac{1}{d}$$

**$d$  : 衍射屏的 ( 空间 ) 周期**

**$f$  : 衍射屏的 ( 空间 ) 频率**

**$f_1$  基频**

- 以简单的平面波入射，透射波为

$$\tilde{U}_2 = \tilde{U}_1 t = A_1 \sum_{-\infty}^{+\infty} \tilde{t}_n e^{i2\pi f_n x} = \sum_{-\infty}^{+\infty} A_1 \tilde{t}_n e^{i2\pi f_n x}$$

- 可以用屏函数表示衍射波（透射波）

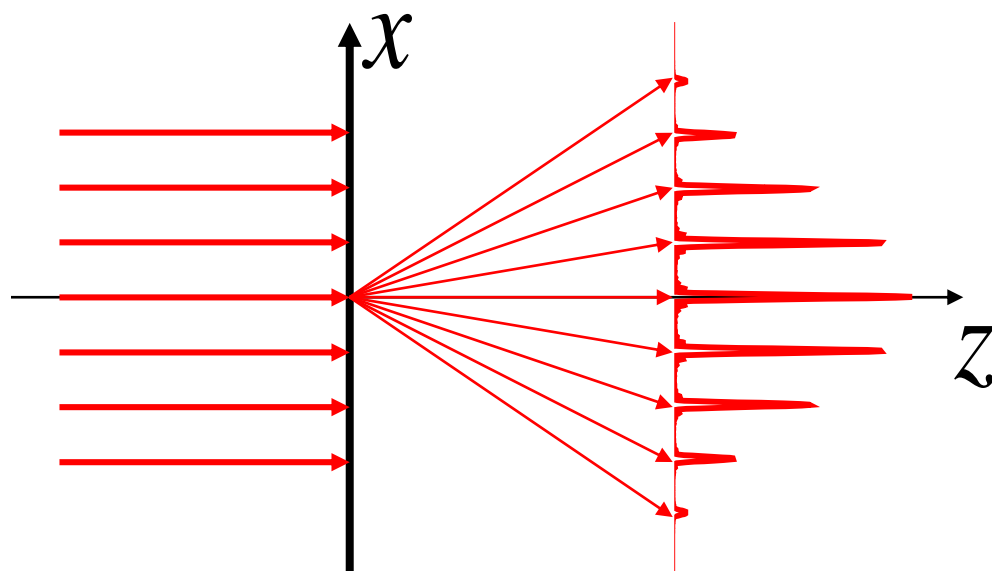
$\tilde{t}_n e^{i2\pi f_n x}$   $n$ 级平面波

$\tilde{t}_n$   $n$ 级平面波的复振幅

$\{\tilde{t}_n\}$  Fourier 频谱

$e^{i2\pi f_n x}$  的方向

$$\sin \theta_n = f_n \lambda$$



## 阿贝对成像过程的理解

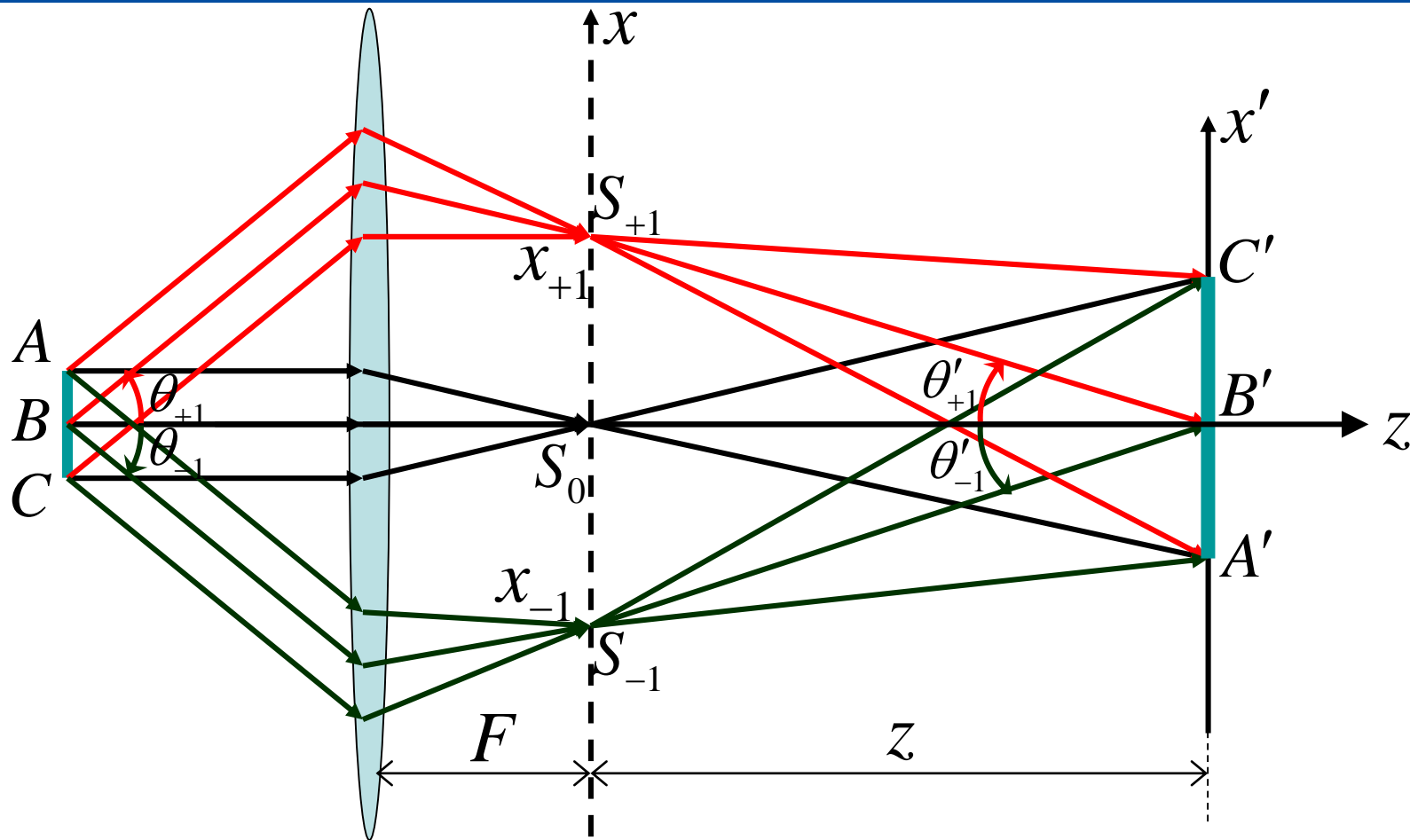
- 一、可以从几何光学的角度，即光线的折射来说明成像过程
  - 二、也可以从Fraunhofer衍射的角度，即对波前的变换来说明成像的过程
- 以正弦光栅的成像说明阿贝成像原理

**正弦光栅被正入射的平面  
光照明而发出的物光波**

$$\tilde{U}_o(x, y) = A_1(t_0 + t_1 \cos 2\pi fx)$$

**物光波实际上包含  
三级平面波**

$$\tilde{U}_o(x) = A_1 t_0 + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{i2\pi fx} + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{-i2\pi fx}$$



第一步，物光波（屏函数的平面波）经过透镜在其焦平面上汇聚成衍射斑(点光源)

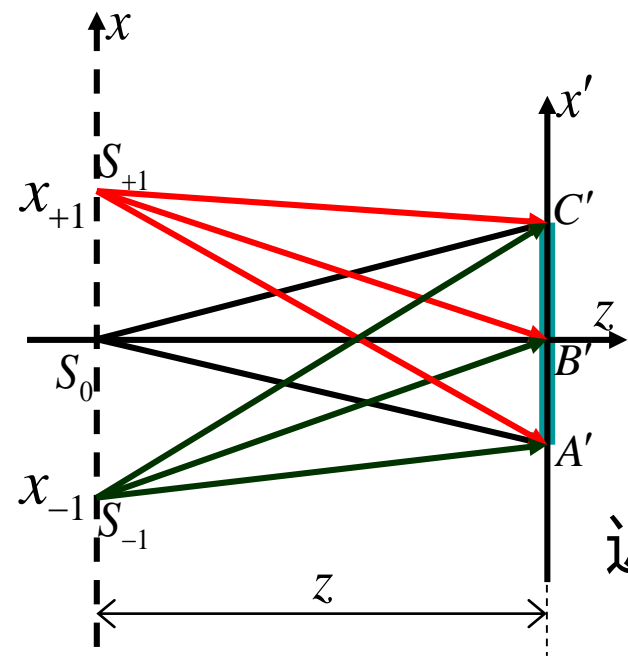
第二步，焦平面上的衍射斑作为相干的点光源，发出的次波在像平面上相干叠加

像平面的光波是三个衍射斑发出光波的相干叠加

$$\tilde{U}_I(x', y') = \tilde{U}_0(x', y') + \tilde{U}_{+1}(x', y') + \tilde{U}_{-1}(x', y')$$

$$\tilde{U}(x', y') = K\tilde{U}(x, y)F(\theta_0, \theta) \frac{e^{ikr}}{r}$$

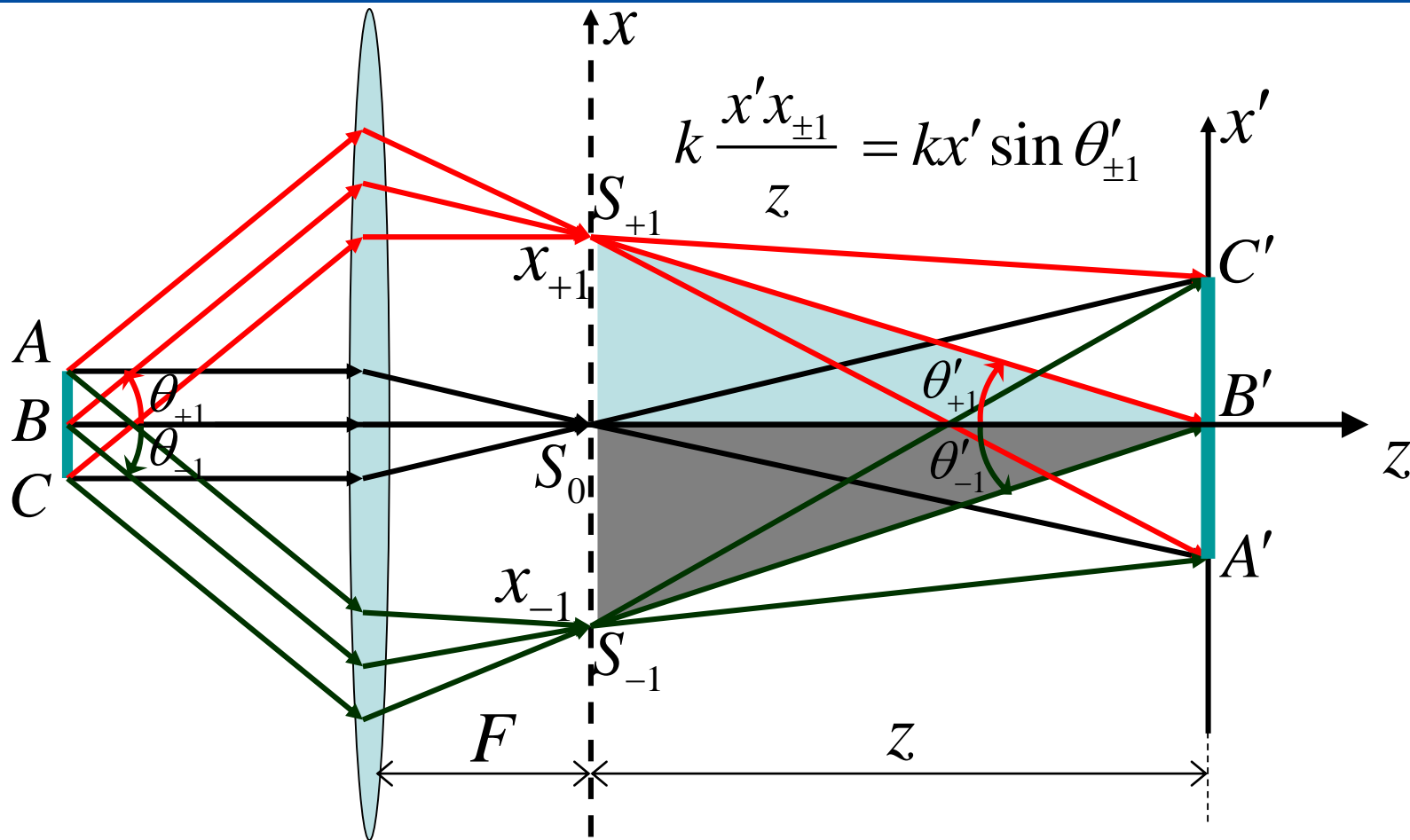
近轴条件下  $\approx \frac{K}{r_0} \tilde{U}(x, y) e^{ikr} \propto \tilde{U}(x, y) e^{ikr}$



三个衍射斑（点光源）发出的光波在像平面上的复振幅

$$\tilde{U}_0(x', y') \propto \tilde{U}_{S_0} \exp[ik(\overline{S_0 B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}]$$

$$\tilde{U}_{\pm 1}(x', y') \propto \tilde{U}_{S_{\pm 1}} \exp[ik(\overline{S_{\pm 1} B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z} - ik \frac{x' x_{\pm 1}}{z}]$$



$$k \frac{x' x_{\pm 1}}{z} = k x' \sin \theta'_{\pm 1}$$

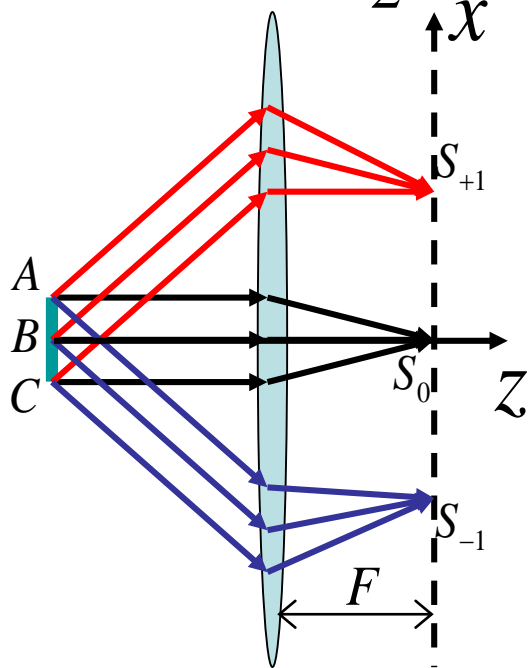
阿贝正弦条件  $\frac{\sin \theta'_{\pm 1}}{\sin \theta_{\pm 1}} = \frac{ny}{n'y'} = \frac{1}{V}$

$$\sin \theta'_{\pm 1} = \frac{\sin \theta_{\pm 1}}{V}$$

$$k \frac{x' x_{\pm 1}}{z} = k x' \sin \theta'_{\pm 1} = k \sin \theta_{\pm 1} \frac{x'}{V} = \frac{2\pi}{\lambda} (\pm f \lambda) \frac{x'}{V} = \frac{\pm 2\pi f x'}{V}$$

$$\begin{aligned}\tilde{U}_0(x', y') &\propto \tilde{U}_{S_0} \exp[ik(\overline{S_0 B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}] \\ &\propto A_1 t_0 \exp[ik(\overline{BS_0})] \exp[ik(\overline{S_0 B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}]\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\tilde{U}_{\pm 1}(x', y') &\propto \tilde{U}_{S_{\pm 1}} \exp[ik(\overline{S_{\pm 1} B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z} - i \frac{\pm 2\pi f x'}{V}] \\ &\propto \frac{1}{2} A_1 t_1 \exp[ik(\overline{BS_{\pm 1}})] \exp[ik(\overline{S_{\pm 1} B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z} - i \frac{\pm 2\pi f x'}{V}]\end{aligned}$$



物光波是正弦光栅的屏函数

$$\tilde{U}_o(x, y) = A_1(t_0 + t_1 \cos 2\pi f x)$$

设物平面B点的相位为0

衍射斑

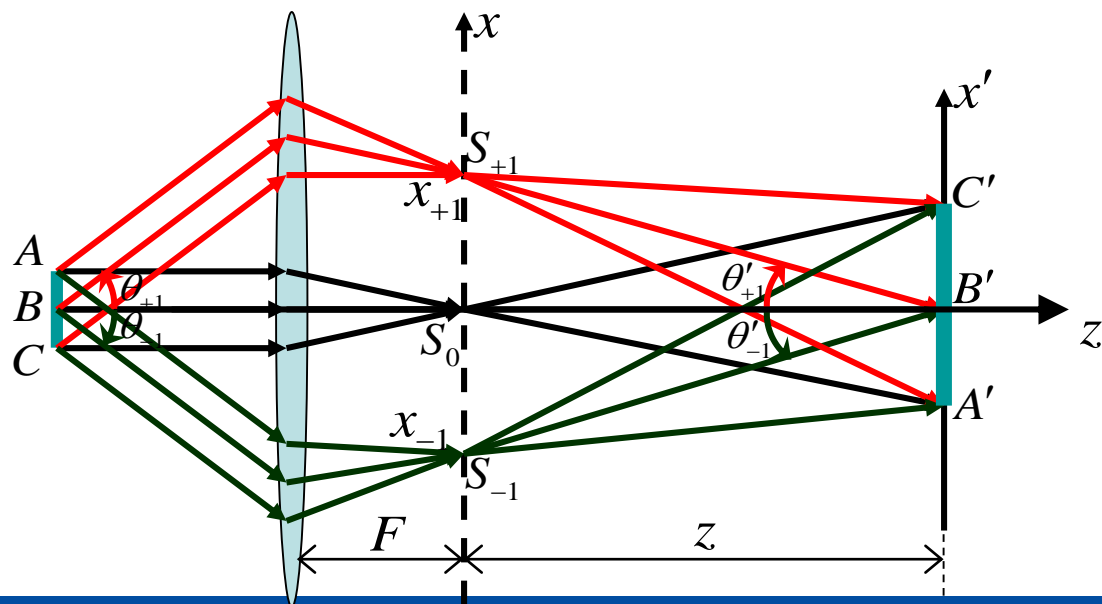
$$\tilde{U}_{S_0} \propto A_1 t_0 \exp[ik(\overline{BS_0})]$$

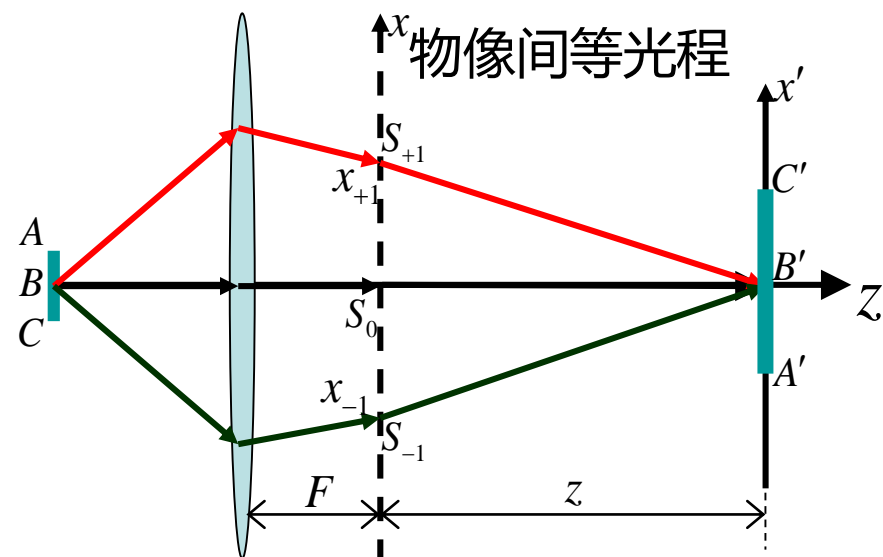
$$\tilde{U}_{S_{\pm 1}} \propto \frac{1}{2} A_1 t_1 \exp[ik(\overline{BS_{\pm 1}})]$$



$$\begin{aligned} \tilde{U}_0(x', y') &\propto A_1 t_0 \exp[ik(\overline{BS_0})] \exp[ik(\overline{S_0 B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}] \\ &\propto A_1 t_0 \exp[ik(\overline{BS_0 B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \tilde{U}_{\pm 1}(x', y') &\propto \frac{1}{2} A_1 t_1 \exp[ik(BS_{\pm 1})] \exp[ik(\overline{S_{\pm 1} B'}) + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z} - i \frac{\pm 2\pi f x'}{V}] \\ &\propto \frac{1}{2} A_1 t_1 \exp[ik(BS_{\pm 1} B') + ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z}] \exp[-i \frac{\pm 2\pi f x'}{V}] \end{aligned}$$





$$\overline{(BS_0B')} = (BS_{+1}B') = (BS_{-1}B')$$

$$k\overline{(BS_0B')} + k\frac{x'^2 + y'^2}{2z}$$

$$= k(BS_{\pm 1}B') + k\frac{x'^2 + y'^2}{2z} = \varphi(x', y')$$

$$\tilde{U}_0(x', y') \propto A_1 t_0 \exp\left[ik\overline{(BS_0B')} + ik\frac{x'^2 + y'^2}{2z}\right] = A_1 t_0 e^{i\varphi(x', y')}$$

$$\tilde{U}_{\pm 1}(x', y') \propto \frac{1}{2} A_1 t_1 \exp\left[ik(BS_{\pm 1}B') + ik\frac{x'^2 + y'^2}{2z}\right] \exp\left[-i\frac{\pm 2\pi fx'}{V}\right]$$

$$= \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{i\varphi(x', y')} \exp\left[-i\frac{\pm 2\pi fx'}{V}\right]$$

$$\tilde{U}_0(x', y') \propto A_1 t_0 e^{i\varphi(x', y')}$$

$$\tilde{U}_{\pm 1}(x', y') \propto \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{i\varphi(x', y')} \exp\left[-i \frac{\pm 2\pi f x'}{V}\right]$$

$$\tilde{U}_I(x', y') = \tilde{U}_0(x', y') + \tilde{U}_{+1}(x', y') + \tilde{U}_{-1}(x', y')$$

$$\propto A_1 e^{i\varphi(x', y')} \left\{ t_0 + \frac{t_1}{2} \left[ \exp\left(-\frac{i2\pi f x'}{V}\right) + \exp\left(+\frac{i2\pi f x'}{V}\right) \right] \right\}$$

像光波  $\tilde{U}_I(x', y') \propto A_1 e^{i\varphi(x', y')} \left( t_0 + t_1 \cos 2\pi \frac{f}{V} x' \right)$

物光波  $\tilde{U}_O(x, y) = A_1 (t_0 + t_1 \cos 2\pi f x)$

像平面光波与物平面光波是相似的，即两者是物像关系

空间频率： $f \rightarrow f/V$ ，表示像的几何放大或缩小。

像质的反衬度：交流部分与直流部分的比值。反衬度不变

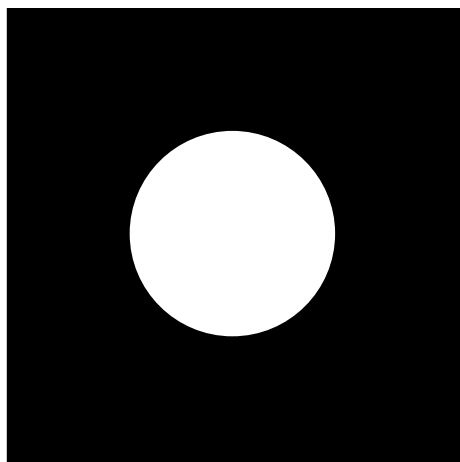
## 2.空间滤波的概念

- 空间频率与波的衍射角相关，

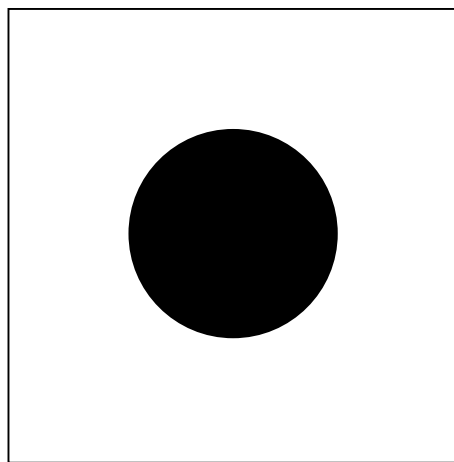
可以据此做成低通、高通或带通的滤波装置

$$\sin \theta_{\pm n} = f_{\pm n} \lambda = \pm \frac{n}{d} \lambda \quad f = \frac{1}{d} \quad \text{衍射屏或物的空间频率}$$

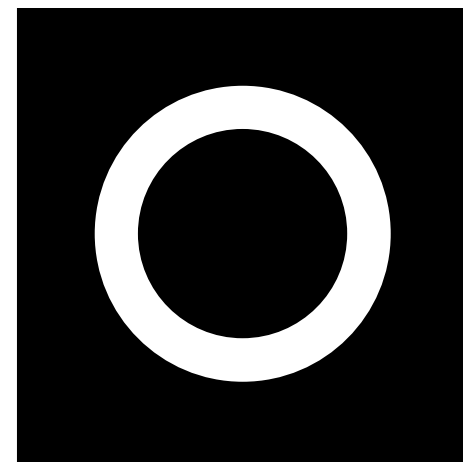
置于夫琅和费衍射系统中透镜的焦平面处



低通

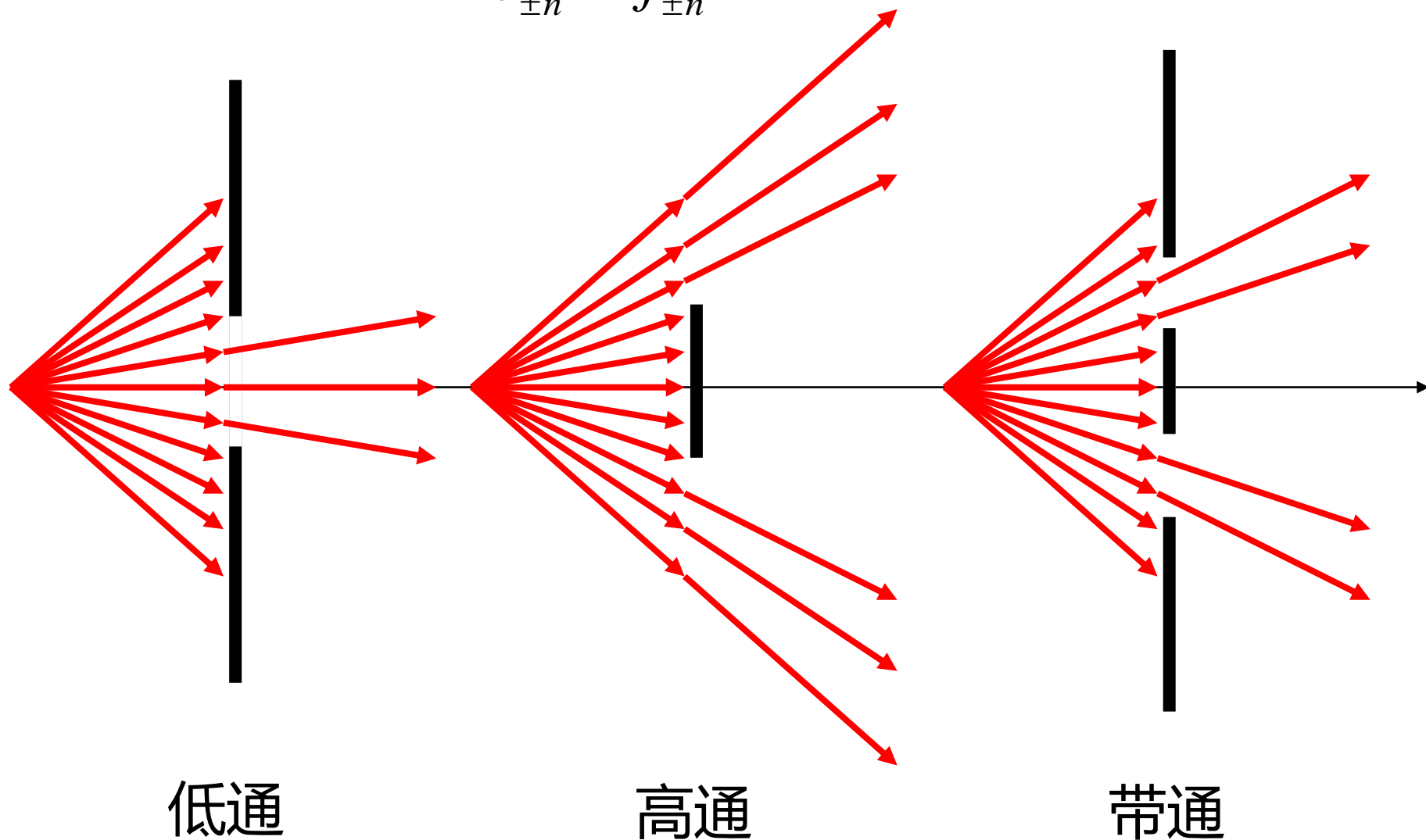


高通



带通

$$\sin \theta_{\pm n} = f_{\pm n} \lambda$$



例：估算相干成像系统的截止空间频率 $f_M$ ？

能够收集的最大衍射角为：

$$\sin \theta_M \approx \frac{D}{2F}$$

对应的最大空间频率：

$$f_M = \frac{\sin \theta_M}{\lambda} = \frac{D}{2F\lambda}$$

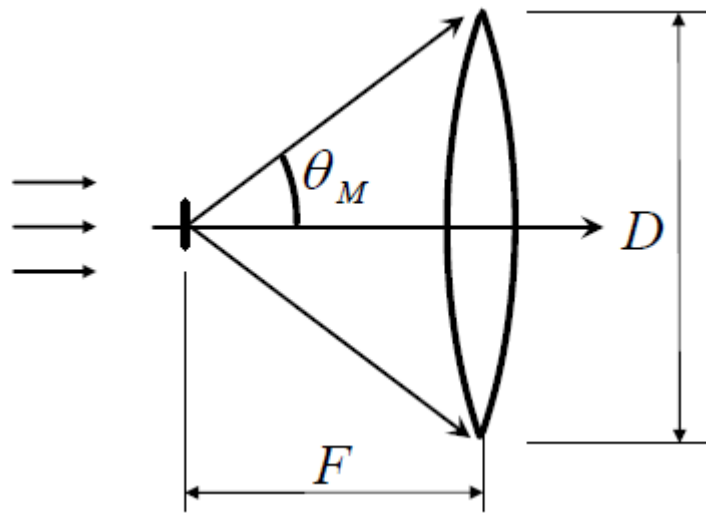
如果波长为600nm,  $D/F=1/3$

$$f_M = \frac{1}{2 \times 3 \times 600} = 278 \text{mm}^{-1}$$

$\Delta x < \Delta x_m = 1/f_M \approx 3.6 \mu\text{m}$  的信息被截止，因此不能分辨。

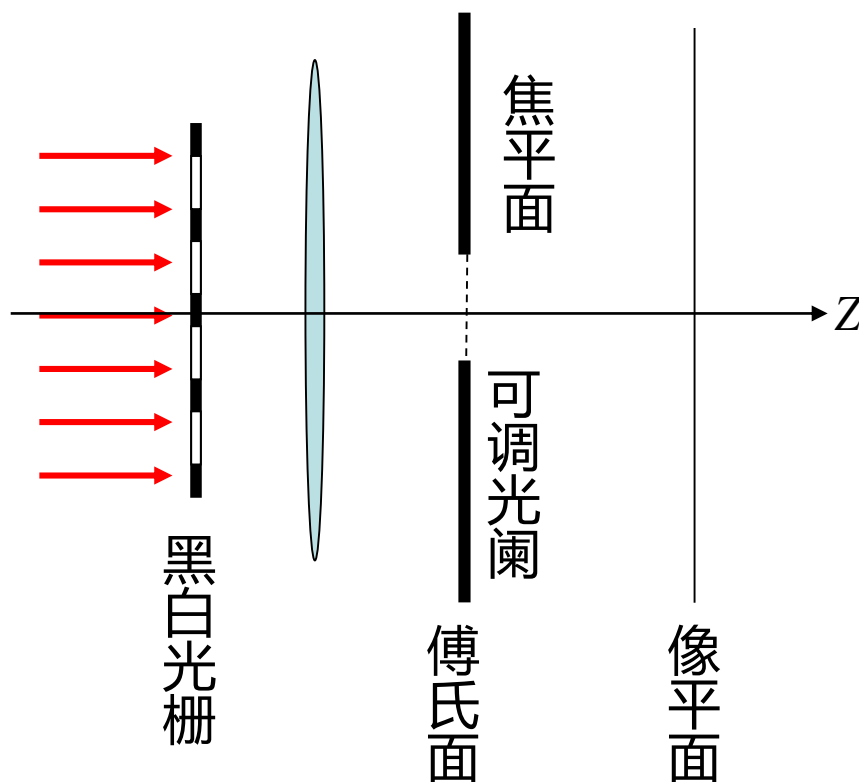
Abbe成像原理→显微镜的分辨率极限

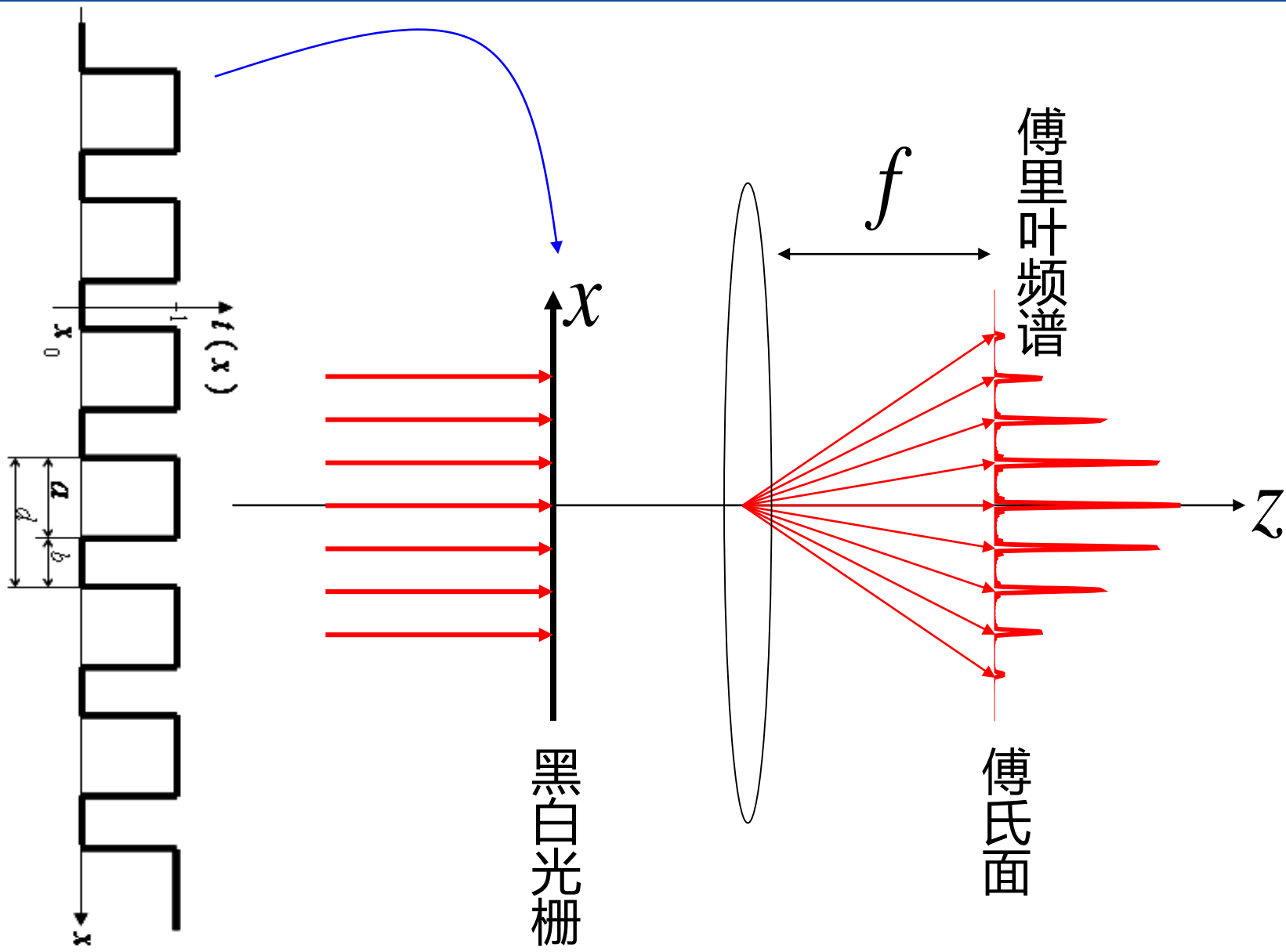
1. 近场光学扫描显微镜 ( NSOM )
2. 负折射率完美成像



### 3. 阿贝—Porter空间滤波实验

- 以黑白光栅为物，单色平行光照射
- 在傅氏面上加一可调狭缝，观察像的变化

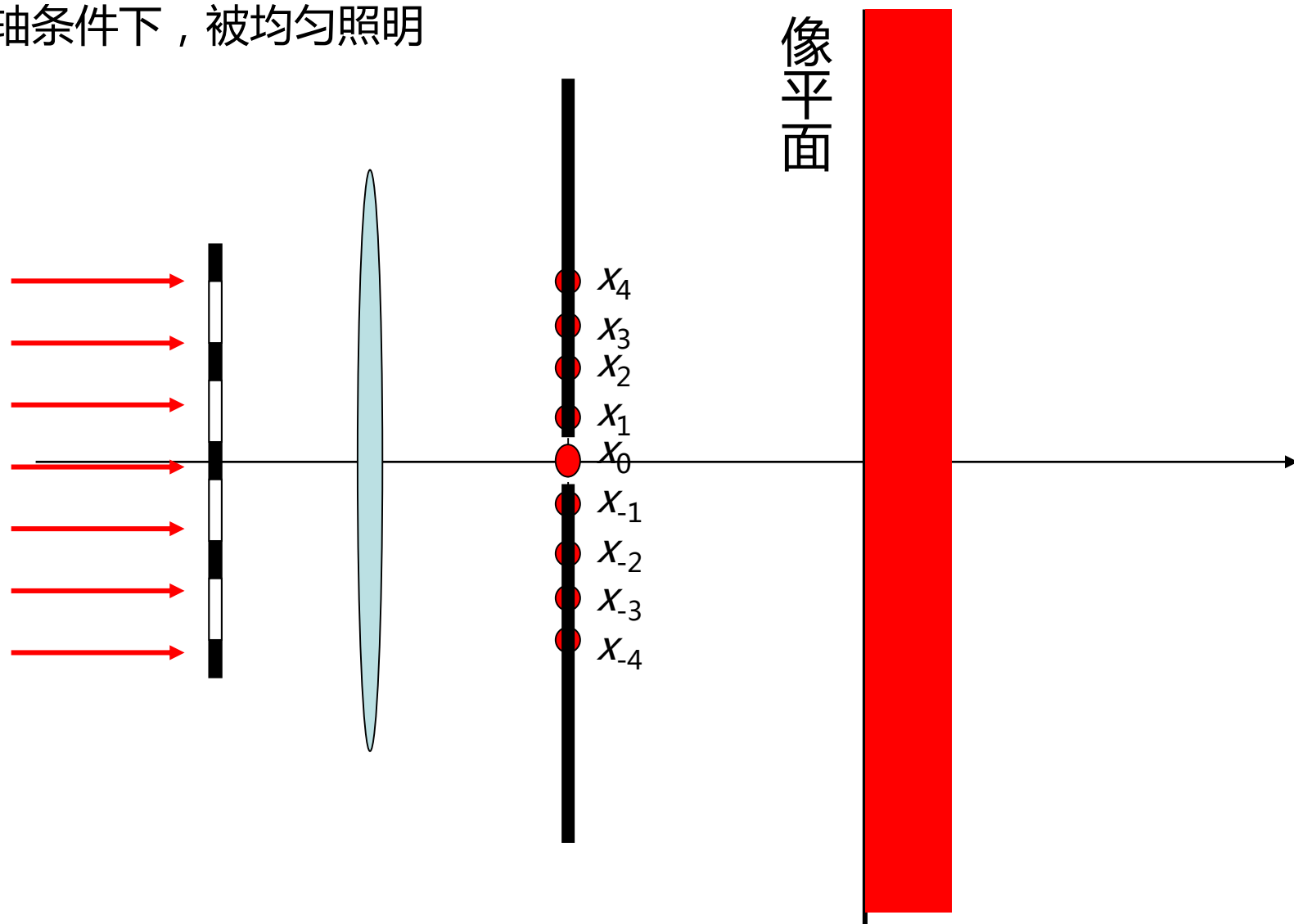






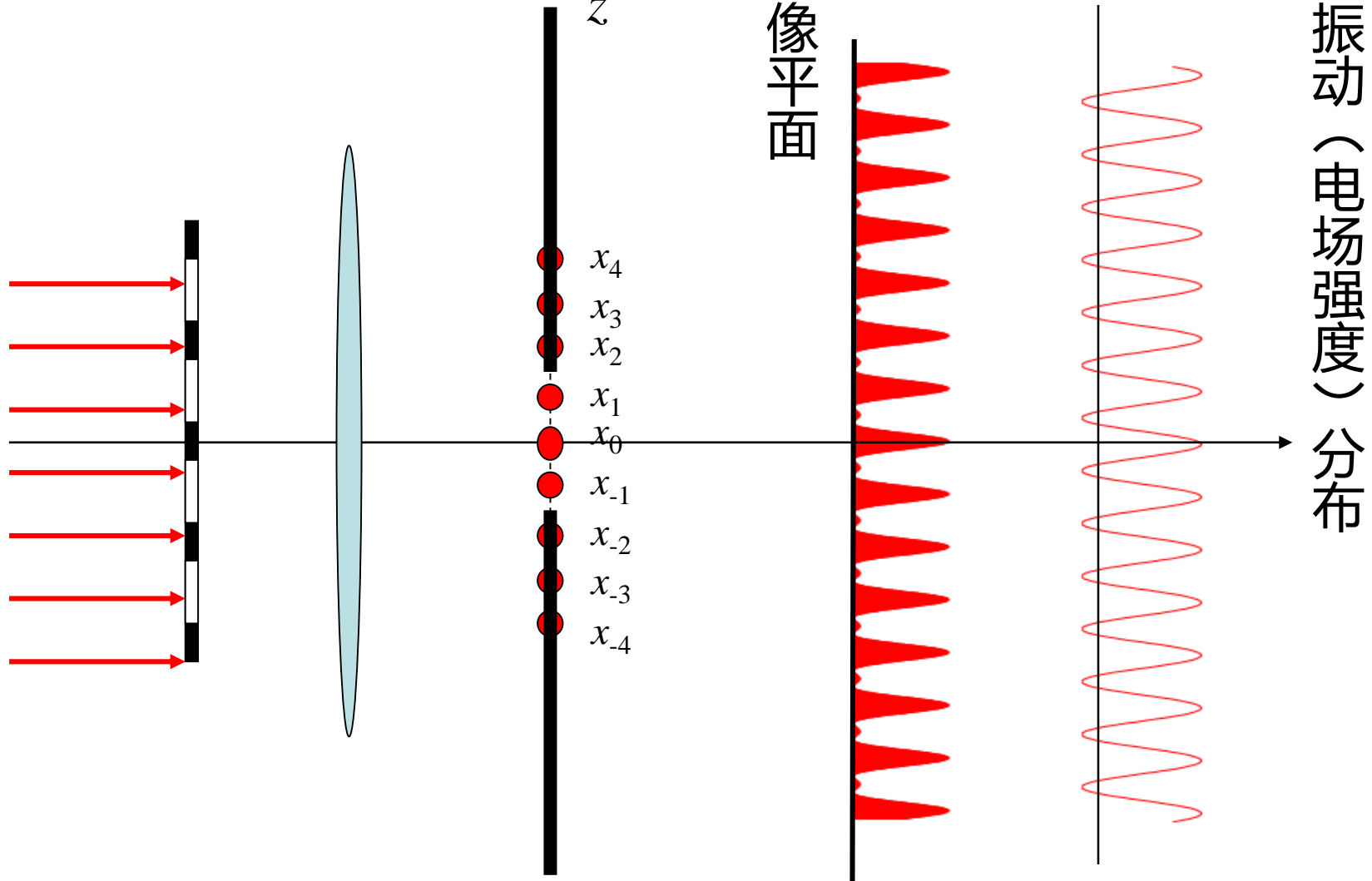
只让0级，即直流成分通过，则像平面被0级斑发出的球面波照明。

近轴条件下，被均匀照明



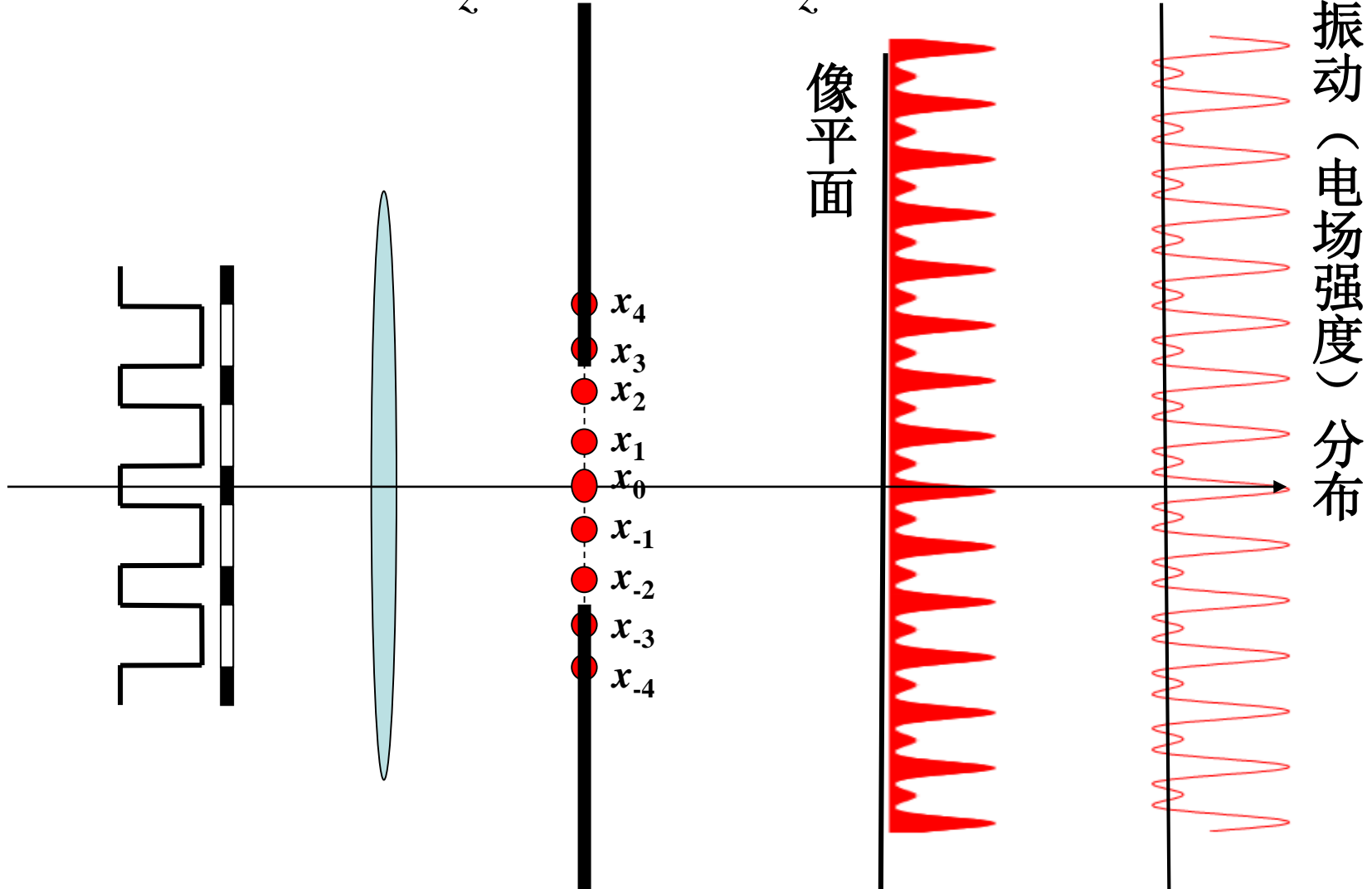
让0级和±1级通过，则像平面上是0和±1三个衍射斑发出的次波的相干叠加

$$U_I \propto a_0 + 2a_1 \cos(k \frac{x_1}{z} x)$$



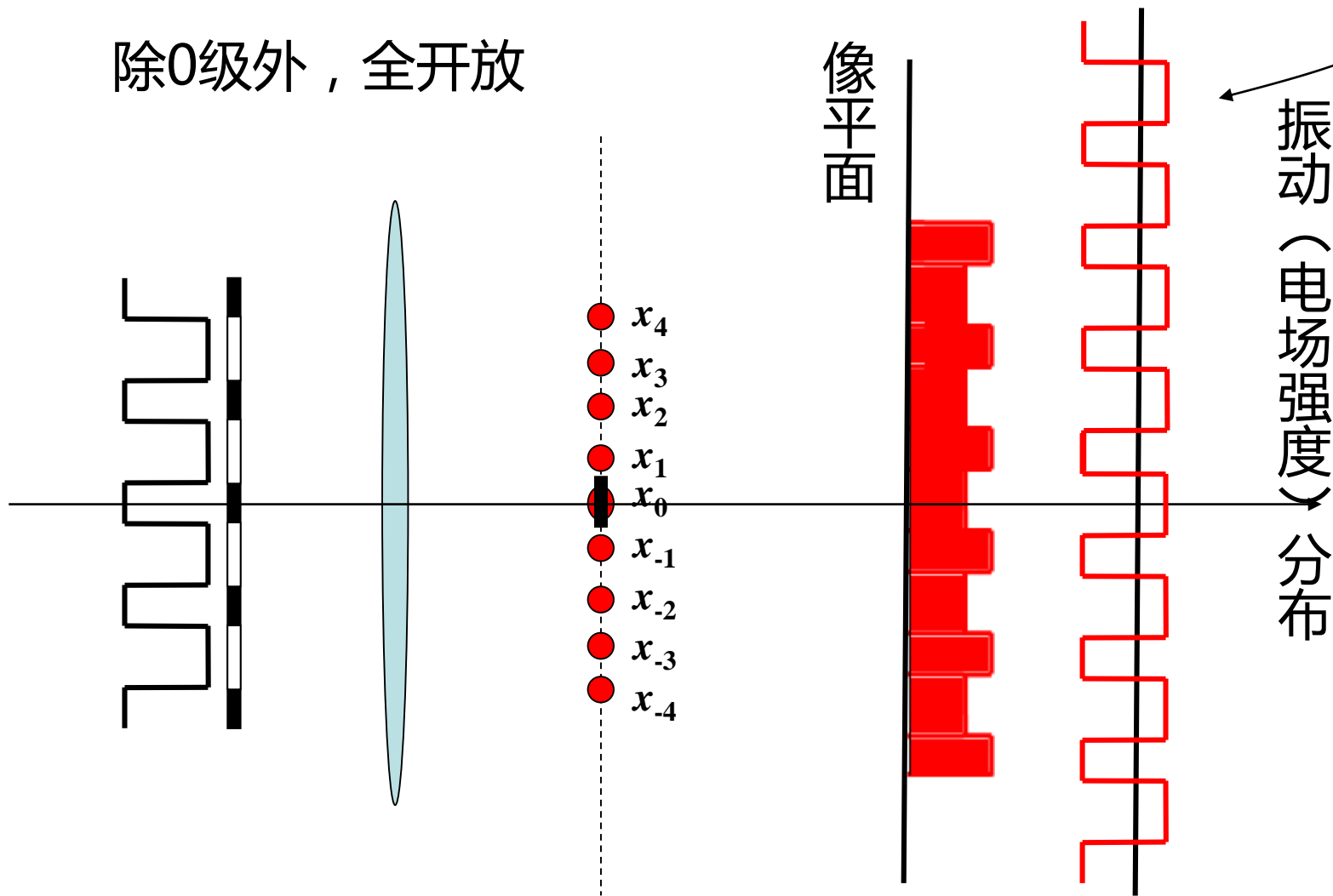
让0级、 $\pm 1$ 和 $\pm 2$ 级通过，则像平面上是5个衍射斑发出的次波的相干叠加

$$\tilde{U}_I \propto a_0 + 2a_1 \cos\left(k \frac{x_1}{z} x\right) + 2a_2 \cos\left(k \frac{x_2}{z} x\right)$$



$$\tilde{U}_I \propto a_1 \cos(k \frac{x_1}{z} x) + a_2 \cos(k \frac{x_2}{z} x) + a_3 \cos(k \frac{x_3}{z} x) + a_4 \cos(k \frac{x_4}{z} x) + \dots$$

除0级外，全开放



## 4. 相衬显微镜 ( F. Zernike, 泽尼克1935 Nobel Laureate )

- 很薄的透明样品，例如生物切片，对光的吸收很小，因而不同的部分反差较小，在显微镜下观察，不容易分辨细节。
- 这类样品，不会引起透射光振幅的改变，所以**不是振幅型**的；
- 但由于各处折射率并不相同，因而透射光的相位会有改变，**是相位型**的。
- 针对这一特点，可以通过**相移**的方式增大图像的反衬度。

## 相移的原理

- 样品的屏函数为  $\tilde{t}(x, y) = e^{i\varphi(x, y)}$
- 即在样品平面处，相位因子各不相同
- 平面光照射样品，物平面发出的物光波为

$$\tilde{U}_o(x, y) = A_1 \tilde{t}(x, y) = A_1 e^{i\varphi(x, y)} = A_1 \left( 1 + i\varphi - \frac{\varphi^2}{2!} - \frac{i\varphi^3}{3!} + \dots \right)$$

- 衍射后在傅里叶面上形成一系列衍射斑
- 在傅里叶面上0级斑处加一滴液体，使直流成分产生一个附加的相位 $\delta$ ，即产生相移。

## 相移对光强的影响

$$\begin{aligned}\tilde{U}_I(x, y) &= \tilde{U}_O(x, y)e^{i\delta} = A_1 e^{i[\varphi(x, y) + \delta]} \stackrel{\text{仅作用于0级}}{=} A_1 \left( e^{i\delta} + i\varphi - \frac{\varphi^2}{2!} - \frac{i\varphi^3}{3!} + \dots \right) \\ &= A_1 \left( e^{i\delta} - 1 + 1 + i\varphi - \frac{\varphi^2}{2!} - \frac{i\varphi^3}{3!} + \dots \right) = A_1 [(e^{i\delta} - 1) + e^{i\varphi}]\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}I &= A_1^2 (e^{i\delta} - 1 + e^{i\varphi})(e^{-i\delta} - 1 + e^{-i\varphi}) \\ &= A_1^2 [3 + e^{i(\delta-\varphi)} + e^{-i(\delta-\varphi)} - e^{i\delta} - e^{-i\delta} - e^{i\varphi} - e^{-i\varphi}] \\ &= A_1^2 [3 + 2\cos(\delta - \varphi) - 2\cos\delta - 2\cos\varphi]\end{aligned}$$

光强与样品的相位分布有关

## 相衬显微术

$$I = A_1^2 [3 + 2 \cos(\delta - \varphi) - 2 \cos \delta - 2 \cos \varphi]$$

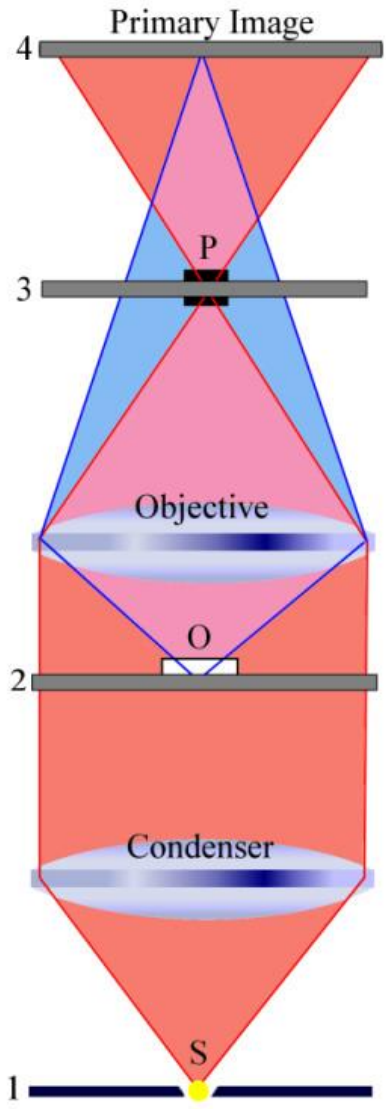
$$= A_1^2 [3 + 2 \cos \delta \cos \varphi + 2 \sin \delta \sin \varphi - 2 \cos \delta - 2 \cos \varphi]$$

生物切片，样品很薄，因而  $\varphi \ll 1$   $\sin \varphi \approx \varphi$   $\cos \varphi \approx 1$

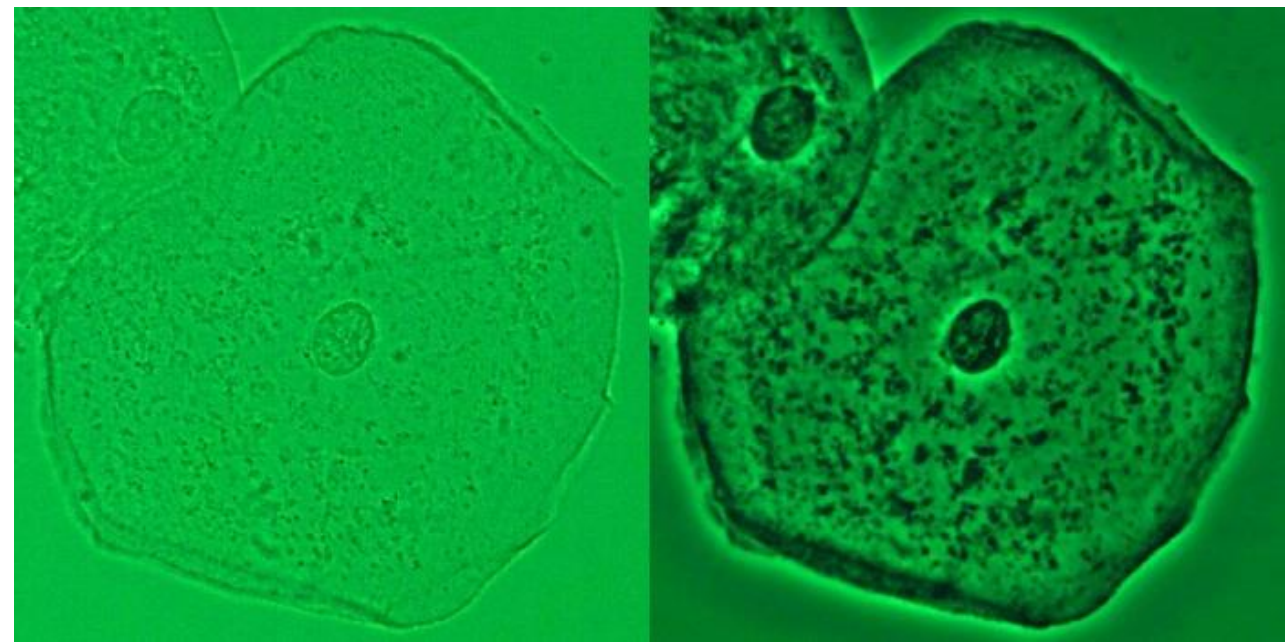
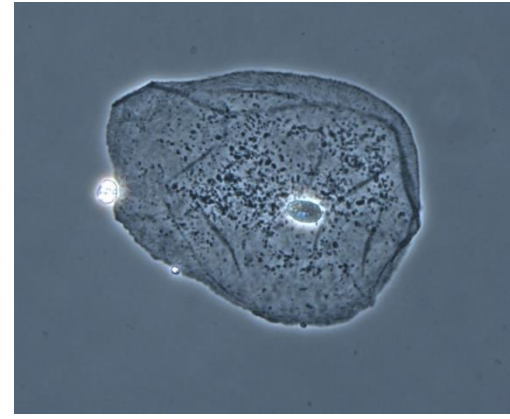
$$I = A_1^2 [3 + 2 \cos \delta + 2\varphi \sin \delta - 2 \cos \delta - 2] = A_1^2 [1 + 2\varphi \sin \delta]$$

像的反衬度取决于  $2\varphi \sin \delta$   $\delta = \pm \frac{\pi}{2}$  反衬度最大





1. Condenser annulus
2. Object plane
3. Phase plate
4. Primary image plane



上皮细胞的相衬显微像

# Frits (Frederik) Zernike (1888~1966)



**作业 : P81: 1, 2**