

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров
ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ, ЧАСТЬ 2



Санкт-Петербург
2020

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров
ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ, ЧАСТЬ 2

Учебное пособие

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 12.03.03 Фотоника и оптоинформатика
в качестве учебно-методического пособия для реализации
основных профессиональных образовательных программ
высшего образования бакалавриата

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург
2020

Виноградова Г.Н., Захаров В.В., Основы микроскопии, часть 2 – СПб: Университет ИТМО, 2020. – 248 с.

Рецензент: Вениаминов Андрей Викторович, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник центра "Информационные оптические технологии", Университета ИТМО.

Учебное пособие предназначено для углубленного изучения основ традиционной микроскопии и рекомендуется бакалаврам факультета фотоники и оптоинформатики, обучающимся по программе подготовки «Физика наноструктур» по направлению подготовки 12.03.03 «Фотоника и оптоинформатика» по дисциплинам «Методы и техника микроскопии», «Методы и техника физического эксперимента в оптоинформатике», «Анализ наноструктур методами микроскопии».

Авторы выражают благодарность А.В. Вениаминову и Н.П. Ермачковой за помощь и ценные указания в подготовке пособия.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2020
© Виноградова Г.Н., Захаров В.В., 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	9
ПРЕДИСЛОВИЕ	10
Глава 1. ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МИКРОСКОПА	18
1.1. Освещение рассеянным светом.....	19
1.2. Критическое освещение	20
1.3. Освещение по методу Кёлера.....	20
1.3.1. Освещение по Кёлеру в проходящем свете.....	21
1.3.2. Освещение по Кёлеру в отраженном свете	24
1.4. Источники света.....	26
1.4.1. Лампы накаливания.....	27
1.4.2. Газоразрядные лампы	30
1.4.3. Светодиодные источники	32
Заключение	34
Глава 2. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. КОСОЕ ОСВЕЩЕНИЕ	35
2.1. Метод косо́го освещения	38
2.1.1. Метод косо́го симметричного освещения	38
2.1.2. Метод косо́го несимметричного освещения	39
Заключение	40
Глава 3. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ТЕМНОЕ ПОЛЕ	40
3.1. Метод темного поля в проходящем свете	42
3.2. Метод темного поля в отраженном свете.....	46
Заключение	48
Глава 4. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ	48
4.1. Сравнение первичных изображений амплитудной и фазовой решеток	50
4.2. Принцип работы метода фазового контраста	54
4.3. Конструктивные особенности и примеры изображений	56
4.4. Оптический артефакт фазового контраста.....	57
Заключение	58

Глава 5. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ КОНТРАСТ	58
5.1. Краткая историческая справка	60
5.2. Поляризованный свет и поляризационные компоненты ДИК.....	61
5.2.1. Эллиптически поляризованный свет.....	61
5.2.2. Эффект двойного лучепреломления и призма Волластона	63
5.2.3. Фазовые пластинки и компенсатор Сенармона	64
5.3. Принцип дифференциально-интерференционного контраста.....	65
5.3.1. Действие призмы Волластона как светоделителя.....	67
5.3.2. Настройка интерферометра.....	68
5.4. Оптическое окрашивание изображения с помощью компенсатора Сенармона.....	71
5.5. Введение в компенсатор Сенармона дополнительной одноволновой фазовой пластинки	72
5.6. Применение двулучепреломляющей призмы Номарского	73
5.7. Сравнение методов фазового контраста и ДИК	75
Заключение	76
Глава 6. ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ	77
6.1. Ортоскопический и коноскопический методы исследования анизотропных объектов.....	78
6.2. Принцип работы поляризационного микроскопа	79
6.2.1. Ортоскопический метод	79
6.2.2. Коноскопический метод	81
6.3. Основные детали и узлы поляризационного микроскопа	84
6.3.1. Объективы и окуляры	85
6.3.3. Столик и препаратоводитель	87
Заключение	87
Глава 7. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ	88
7.1. Общие сведения об интерферометрах и интерференционных картинах	88
7.1.1. Интерференционные полосы, их ширина и форма.....	88
7.1.2. Когерентность.....	90
7.2. Оптические схемы двухлучевых интерферометров, применяемых в интерференционных микроскопах	91

7.2.1. Интерферометр Маха-Цендера	91
7.2.2. Интерферометр сдвига.....	92
7.2.3. Интерферометр Майкельсона	93
7.3. Интерференционный микроскоп отраженного света. Микроинтерферометр Линника	94
7.4. Интерференционный микроскоп проходящего света.....	97
7.4.1. Оптическая схема микроскопа.....	98
7.4.2. Метод интерференционных полос	100
7.4.3. Метод однородного поля.....	103
7.4.4. Частный случай дифференциального метода – метод ДИК ...	109
7.5. Интерференционный микроскоп Peraval.....	109
Заключение	111
Глава 8. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	112
8.1. Введение во флуоресцентный анализ: основные понятия	113
8.2. Спектрофлуориметр и флуориметр	116
8.2.1. Схемы освещения и регистрации флуоресценции.....	116
8.2.2. Спектрофлуориметр.....	117
8.2.3. Флуориметры	118
8.3. История создания люминесцентного микроскопа	120
8.4. Люминесцентный микроскоп проходящего света.....	123
8.5. Люминесцентный микроскоп отраженного света.....	125
8.5.1. Фотообесцвечивание.....	128
8.5.2. Газоразрядные источники света	130
8.5.3. Интерференционный светоделитель с фильтрами	130
8.5.4. Объективы люминесцентного микроскопа	132
Заключение	134
Глава 9. ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ	136
9.1. Фотонасадка с пленочной фотокамерой	136
9.2. Цифровые фотонасадки	137
9.3. Компьютерная обработка и анализ цифровых изображений.....	139
Заключение	140
Глава 10. МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТР.....	141
10.1. Фотометрия и спектрофотометрия	141

10.2. Основные световые величины.....	142
10.2.1. Поток излучения.....	142
10.2.2. Спектральная плотность потока излучения	142
10.2.3. Освещенность и сила излучения.....	143
10.2.4. Энергетическая яркость.....	144
10.3. Микроскоп как передатчик световой энергии.....	144
10.3.1. Инвариант яркости вдоль луча	144
10.3.2. Инвариантность схемы микроскопа.....	145
10.4. Абсорбционный анализ.....	146
10.4.1. Закон поглощения света	147
10.4.2. Измерение поглощения на спектрофотометре.....	148
10.5. Микроспектрофотометрия.....	149
10.5.1. Оптическая схема микроспектрофотометра.....	150
10.5.2. Световая трубка и условие фотометрирования.....	153
10.5.3. Влияние рассеянного света	153
10.5.4. Влияние размера освещаемого поля и соотношение апертур.....	154
10.6. Подготовка препарата	154
10.7. Ошибка распределения	156
10.8. Метод сканирования.....	158
10.8.1. Принцип метода	158
10.8.2. Сканирующие устройства	159
10.9. Приемники излучения	162
10.9.1. Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ)	162
10.9.2. Фотодиод и фотодиодная линейка	166
Заключение	167
Глава 11. СРЕДСТВА МОНОХРОМАТИЗАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ ..	169
11.1. Светофильтры	169
11.1.1. Абсорбционные фильтры	169
11.1.2. Интерференционные фильтры.....	170
11.1.3. Интерференционные линейки.....	172
11.2. Спектральные приборы.....	173
11.2.1. Основные характеристики спектрального прибора.....	174

11.2.2. Диспергирующие элементы	176
11.3. Монохроматор.....	182
11.3.1. Призмный одинарный монохроматор.....	182
11.3.2. Одинарный монохроматор с дифракционной решеткой	183
11.3.3. Двойной монохроматор	185
11.4. Полихроматор	186
11.5. Согласование монохроматора с микроскопом	187
Заключение.....	189
12.1. Спектроскопия комбинационного рассеяния	190
12.1.1. Принцип работы рамановского микроспектрометра	191
12.1.2. Рамановский микроспектрометр	193
12.2. Лазерный сканирующий конфокальный люминесцентный микроскоп.....	195
12.2.1. Принципиальная оптическая схема.....	195
12.2.2. Получение изображения и процесс сканирования	197
12.2.3. Предел разрешения в плоскости изображения	199
12.2.4. Конфокальная диафрагма и толщина оптического среза	202
12.2.5. Влияние шумов лазеров и приемно-регистрирующей системы.....	204
12.2.6. Серия срезов.....	205
12.2.7. Подготовка препарата.....	206
12.2.8. Выбор объектива	207
12.3. Конструкция конфокального микроскопа LSM 710	212
12.3.1. Компоновка оптических и регистрирующих устройств	214
12.3.2. Полихроматор и приемники излучения	215
Заключение	221
Глава 13. ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА	222
13.1. Электронная микроскопия.....	223
13.1.1. Основы электронной микроскопии	225
13.1.2. Просвечивающий электронный микроскоп	225
13.1.3. Общие сведения о методах приготовления препаратов.....	227
13.1.4. Повышение контрастности изображений.....	228
13.2. Сканирующие зондовые микроскопы	229

13.2.1. Принцип работы	229
Заключение	231
Приложение 1. ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ДИФРАКЦИИ.....	232
Историческое введение	232
Геометрическая теория дифракции	234
Приложение 2. ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА	239
ЛИТЕРАТУРА	243

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее пособие является логическим продолжением материала, изложенного в первой части «Основы микроскопии» [1]. В первой части этого пособия представлены: история микроскопии, характеристики зрительного анализатора человека, теория образования изображения в микроскопе, основные оптические и механические узлы микроскопа и др.

Специфика микроскопии, обусловленная сложностью аппаратуры и своеобразием объекта, требует от студентов определенных знаний для получения надежных результатов и правильного их толкования. Однако не следует забывать, что нельзя добиться достоверных результатов с неправильной настройкой микроскопа и небрежной подготовкой препарата. Поэтому вторая часть «Основ микроскопии» начинается с изложения методов освещения и различных типов источников излучения. Большое внимание также уделяется основным методам контрастирования.

Разумеется, ни один учебный курс не в состоянии охватить огромное количество методов и приборов современной оптической микроскопии, используемых в различных областях физики, биологии, химии и медицины. В рамках данного пособия упор делается на достаточно детальное рассмотрение ограниченного числа вопросов с тем, чтобы полученные знания и навыки могли использоваться студентами как для их текущей научно-исследовательской работы, так и для дальнейшего, более углубленного изучения специальных вопросов микроскопии. Укажем относительно сложные главы данного пособия, которые можно рекомендовать отдельным студентам для углубленного изучения дисциплины. Это главы 5, 7 и 12, в которых подробно разобраны дифференциально-интерференционный контраст (ДИК), интерференционный и конфокальный методы микроскопии.

Учебное пособие предназначено для бакалавров, обучающихся по учебной программе «Физика наноструктур» по дисциплинам «Методы и техника микроскопии», «Приборы и методы экспериментальной физики», «Анализ наноструктур методами микроскопии», и может использоваться для подготовки к лекциям, лабораторным работам и экзаменам.

Учебное пособие также может быть рекомендовано студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в исследовании наноструктур.

ПРЕДИСЛОВИЕ

В 1726 году была создана оптико-механическая мастерская при Академии Наук, официальное открытие которой состоялось в Санкт-Петербурге 27 декабря 1725 года. Академия Наук обладала прекрасной коллекцией микроскопов и других оптических приборов, привезенных из разных стран Европы. В мастерской, возглавляемой И.Е. Беляевым, умели изготавливать все типы микроскопов, образцы которых имелись в «Оптической камере» Физического кабинета. В 1769 году по распоряжению Екатерины II на службу в Академию Наук был принят И.П. Кулибин (1735 – 1818) в качестве механика и руководителя мастерской [1].

Государством перед Академией Наук была поставлена задача развития медицины и подготовки собственных медицинских кадров. Для обучения медиков требовались, в частности, лупы и микроскопы. По указанию Л. Эйлера (1707 – 1783) в мастерских стали разрабатывать ахроматический микроскоп, первый в мире экземпляр которого был изготовлен в 1784 году под руководством академика Эпинуса (1724 – 1802). Экземпляр второй, более совершенной модели микроскопа Эпинуса, созданной около 1806 года, хранится в Государственном политехническом музее в Москве.

Однако в 1801 году оптическая мастерская Академии Наук по причинам, оставшимся невыясненными, навсегда прекратила свою деятельность. Так печально прервалась возможность создания российского оптического приборостроения на базе академических мастерских. Упадок производства оптических приборов в XIX веке, по видимому, был связан с отказом государства от участия в развитии этой отрасли производства [1]. Сравнительно небольшие потребности армии и флота в оптических приборах было решено удовлетворять за счет импорта.

Русско-японская война (1904 – 1905) наглядно показала значение оптических приборов для наземной и морской артиллерии [2]. В армии не хватало или отсутствовали прицелы, панорамы, полевые бинокли, стереотрубы, дальномеры и т.д. После этой войны для решения проблемы оснащения армии оптическими приборами привлекают генерала флота А.Н. Крылова и его сотрудника генерал-майора Я.Н. Перепелкина (рис. 1).

Последующая Первая мировая война (1914 – 1918) заставила правительство серьезно задуматься над *катастрофическим* положением со снабжением русской армии и флота оптическими приборами, так как поставка этих приборов оказалось целиком зависящей от импорта.

На территории России имелись только небольшие оптические мастерские, расположенные на Обуховском заводе, и мастерские фирмы

Цейсс, в которых приборы собирались из немецких оптических деталей и механических узлов. Эти мастерские не могли удовлетворить возросший спрос, а, кроме того, они зависели от импорта оптического стекла.



А.Н. Крылов (1863 – 1945) [3]



Я.Н. Перепелкин (1874 – 1935) [3]

Рис. 1. А.Н. Крылов – академик, генерал флота, основатель русской школы кораблестроения и его сотрудник Я.Н. Перепелкин – генерал-майор, основоположник русской военной оптики.

В результате, в послевоенное время оптические приборы некому и не из чего было создавать: не умели варить оптическое стекло и изготавливать из него детали, рассчитывать оптические схемы и конструировать военные приборы. Нужно было заново создавать оптическую промышленность и обеспечить ее квалифицированными кадрами [2].

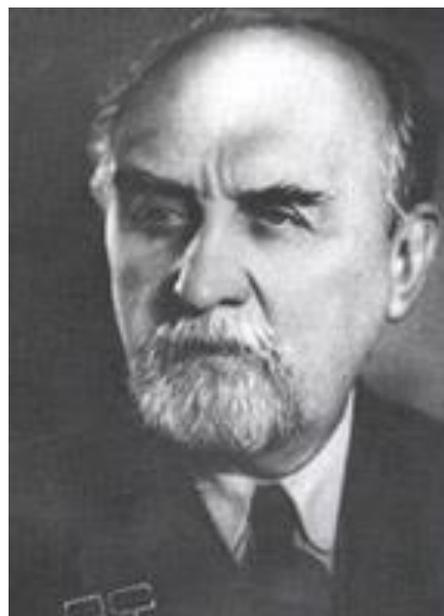
С 1908 года А.И. Тудоровский начинает читать офицерам Артиллерийского училища курсы физики и другие смежные дисциплины. Кроме того, он изучает визуальные приборы и артиллерийские прицелы, а в 1916 году организует оптотехническую лабораторию и вычислительное бюро при Императорском фарфоровом заводе.

В это время по инициативе профессора университета Д.С. Рождественского (рис. 2) на стекольном отделении фарфорового завода начинается подготовка производства оптического стекла.

Итак, в Петрограде на Императорском фарфоровом заводе начинают организовать производство оптического стекла, на Обуховском заводе расширяют оптические мастерские, а Российское акционерное общество (частное предприятие) строит оптико-механическое предприятие на Чугунной улице (Петроград). Но для этих предприятий нужны оборудование и, главное, квалифицированные кадры.



Д.С. Рождественский (1876 – 1940) [3]



А.И. Тудоровский (1875 – 1963) [3]

Рис. 2. Д.С. Рождественский – физик, основатель и первый директор ГОИ (1918), академик (1929) и А.И. Тудоровский – физик, специалист в области теории и расчета оптических приборов и систем, член-корреспондент Академии Наук (1933).

В лабораториях Физического института Петроградского университета под руководством Рождественского ведутся теоретические работы в области оптики, а затем, при участии выпускников И.В. Обреимова и А.А. Лебедева (рис. 3), выпуск 1915 и 1916 годов соответственно – работы по оптическому стеклу. Впоследствии Лебедев разработал теорию отжига оптического стекла, а Обреимов – метод определения оптических констант и однородности оптического стекла.

15 декабря 1918 года учреждают «Государственный оптический институт» (ГОИ), организованный Рождественским, который стал его первым директором. Институт создан на основе нового принципа организации науки – принципа тесного сотрудничества науки и техники. Возглавляемые Тудоровским оптотехническая лаборатория и вычислительное бюро входят в состав ГОИ [2].

Вычислительные отделы разрабатывают методику расчета оптических систем с самых основ. Дело в том, что методика расчета оптических систем в мировой литературе отсутствовала, так как фирмы-производители предпочитали ее не публиковать. Немецкие физики в своих книгах дают только общие представления об оптических схемах и формулах геометрической оптики, применяемых при расчете хода лучей.

Для подготовки молодых научных кадров Рождественский отбирает студентов первого курса Петроградского университета. Они проходят специальный, усиленный курс обучения. Рождественский создает при новом институте группу лаборантов, которых готовят по специальной программе. Он сам во всех деталях разрабатывает

программу подготовки этих лаборантов. В первые годы существования ГОИ более половины университетских физиков работают в институте по совместительству. Впоследствии из этой группы стали известными учеными Л.Н. Гассовский, А.А. Гершун, Е.Ф. Гросс, А.Н. Захарьевский, А.Н. Теренин, В.А. Фок, С.Э. Фриш и др.



А.А. Лебедев (1893 – 1969), – физик, академик (1943). [3]

И.В. Обреимов (1894 – 1981) – физик, преподаватель, академик (1958) [3].

Рис. 3. Выпускники Петроградского университета И.В. Обреимов и А.А. Лебедев, приглашенные Д.С. Рождественским для работы в Физическом институте.

Однако Тудоровский считал, что привлечение только студентов физико-математического факультета недостаточно для решения поставленных задач, так как их образование предназначено для изучения принципиальных вопросов физики, а для работы в узкой области прикладной физики и производственных процессов оптико-механической промышленности нужны специалисты с физико-техническим образованием. Для подготовки таких специалистов в 1918-1920 годах «Ремесленное училище цесаревича Николая» было преобразовано сначала в «Техническую школу», затем в «Техникум точной механики и оптики и часового производства» с четырехгодичным обучением, а в 1930 году – в «Ленинградский институт точной механики и оптики» (ЛИТМО). Молодые сотрудники ГОИ в основном состояли из только что окончивших университет физиков и студентов нового института ЛИТМО.

Рождественский приглашает в ГОИ крупных специалистов-физиков из других городов страны (рис. 4). В 1926 году из Киева приезжает В.П. Линник, из Иркутска Т.П. Кравец, из Одессы (1930)

Д.Д. Максудов, а из Москвы (1932) – С.И. Вавилов с группой сотрудников, среди которых был Е.М. Брумберг.

С.И. Вавилов пришел в ГОИ уже известным ученым, работы которого в области люминесценции растворов красителей, приведшие к весьма широким обобщениям, получили всеобщее признание.



С.И. Вавилов (1891–1951),
физик, академик (1932),
Президент Академии наук (1945) [3].



В.П. Линник (1889 – 1984),
физик, академик (1939) [3].

Рис. 4. Приглашенные в ГОИ известные ученые-физики С.И. Вавилов и В.П. Линник.

Многогранность научных интересов В.П. Линника характеризует его вклад в теорию и практику астрономических наблюдений, где им предложены новые методы исследований и оригинальные астрономические инструменты, в частности, звездный интерферометр Линника для измерения углового расстояния между двойными звездами.

Микроскопия. ГОИ создан для решения задач, связанных с военной техникой. Наряду с этим ученые Академии наук поставили перед ГОИ задачу организации производства микроскопов и других научных приборов. Эта задача не противоречила интересам Рождественского. Он еще в университете прослушал ряд курсов по биологии, которой продолжал интересоваться и в последующие годы. Рождественский называл микроскоп «царством дифракции и интерференции».

В ГОИ работа по микроскопии началась в 1924 году с разработки оптического стекла и выполнения расчетов оптических систем объективов и окуляров. Огромную организационную и научную деятельность проводит Тудоровский. Под руководством Линника

разрабатывают метод центрировки и сборки объективов микроскопа. К 1936 году ГОИ уже располагает не только аппаратурой, но и специалистами по сборке объективов, а к 1937 году подготавливает кадры для завода. К этому же времени завершаются работы по расчетам и изготовлению поляризационных призм, что дает возможность рассчитать оптическую систему первого отечественного поляризационного микроскопа [2].

В 1930-х годах Рождественский публикует две теоретические статьи по микроскопии, посвященные вопросам теории образования изображения в микроскопе. В первой из них разобраны часто встречающиеся оптические явления при наблюдении прозрачных объектов, а во второй рассмотрен ряд принципиальных вопросов, выясняющих влияние когерентности освещения на изображение объекта. Для характеристики влияния освещения на вид изображения он вводит понятие «коэффициент некогерентности» (отношение апертуры конденсора к апертуре объектива) и показывает, что практически в микроскопе невозможно осуществить полностью некогерентное освещение.



Рис. 5. А.Н. Захарьевский (1894 – 1965), оптиктехник, профессор (1936), член-корреспондент Академии артиллерийских наук (1947) [3].

Большой вклад в развитие микроскопии внес А.Н. Захарьевский (рис. 5), который еще студентом привлекается Рождественским к работе в ГОИ в качестве лаборанта. В 1920 году он заканчивает физико-математический факультет Петроградского университета, но его мобилизуют в армию до 1924 года. После демобилизации его назначают

заведующим физической лабораторией на заводе оптического стекла (ЛенЗОС), находившейся под непосредственным научным руководством ГОИ. В 1928 году Захарьевский создает в ГОИ лабораторию исследования и разработки оптических дальномеров. В 1935 году ему поручают создать лабораторию микроскопии для организации выпуска первых серийных биологических, металлографических и поляризационных микроскопов.

Захарьевский ведет активную преподавательскую деятельность: читает курс лекций в Артиллерийской академии, а с 1930 года – в ЛИТМО. В ЛИТМО он заведует кафедрой оптико-механических приборов (1936 – 1941), а затем становится деканом Оптического факультета (1941 – 1942).

Однако только после окончания войны Захарьевский вновь возвращается в ГОИ и с 1951 года возглавляет лабораторию микроскопии. Для создания поляризационных и интерференционных микроскопов он организует группу из выпускников ЛИТМО (рис. 6). Результаты работы этой группы отражены в главах 5, 6 и 7.



Г.А. Иоффе (1911 – 1980) А.Ф. Кузнецова (1917 – 2008) Л.А. Федин (1929 – 1981)

Рис. 6. Группа выпускников ЛИТМО, работающих в лаборатории микроскопии по созданию поляризационных и интерференционных микроскопов.

Г.А. Иоффе оформляется на работу в ГОИ после окончания ЛИТМО в 1936 году (6-й выпуск), а после войны работает в лаборатории микроскопии в качестве заместителя начальника лаборатории (1951 – 1967). Все отчеты и все статьи лаборатории проходят через ее руки.

К проблемам микроскопии внимательно относились и помогали Рождественский, Вавилов, Лебедев, Линник и др. Еще в 1930 году Лебедев разработал оригинальный поляризационный интерферометр и методы его применения. После экспериментальных разработок нескольких вариантов интерференционного микроскопа проходящего

света, выполненных Захарьевским и Кузнецовой, в основу окончательного варианта была положена идея поляризационного интерферометра Лебедева (см. главы 5 и 7). Реальное осуществление прибора потребовало глубокой научной работы, кропотливого эксперимента и решения ряда технологических задач. Сразу после войны Линник разработал интерференционный микроскоп отраженного света (см. главу 7).

В начале 50-х годов Е.М. Брумберг, который приехал вместе с Вавиловым из Москвы, предлагает применить в люминесцентном микроскопе освещение объекта в отраженном свете, используя разработанные в ГОИ специальные интерференционные светоделительные пластинки (см. главу 8).

Современная микроскопия – наука, базирующаяся не только на классическом микроскопе, актуальность которого не требует пояснений. Это наука, сочетающая оплотехнику с разнообразными разделами физики, электронной и вычислительной техники.

Увы, в 1990-е годы деятельность по разработке и созданию новых световых микроскопов в ГОИ без поддержки со стороны государства тихо сошла на нет...

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Г.Н. История науки и приборостроения. Учебное пособие. СПб: НИУ ИТМО, 2012. 161 с.
2. 50 лет Государственного оптического института им. С.И. Вавилова, сб. статей под ред. Ю.Н. Гороховского. Л.: Машиностроение, 1968. 705 с.
3. Википедия – свободная энциклопедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://wikipedia.org>.

Глава 1. ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МИКРОСКОПА

При разработке теории образования изображения в микроскопе Аббе разделил все объекты на самосветящиеся и несамосветящиеся, а несамосветящиеся, в свою очередь, разделил на амплитудные и фазовые [1]. Однако большинство объектов микроскопии являются именно несамосветящимися, и поэтому для получения изображения его необходимо осветить с помощью внешнего источника излучения.

Глаз человека может воспринять изображение неоднородной структуры объекта только в том случае, если элементы этой структуры различаются между собой по яркости или по цвету [2]. Различия в изображении структур препарата зависят от разницы амплитуд и/или фаз световых волн, прошедших (или отраженных) через разные участки препарата. По этим различиям исследуют качественные и количественные характеристики объекта. Освещение всех структур препарата должно осуществляться в одинаковых условиях, что особенно важно при количественных исследованиях. Например, пусть на препарате расположены две структуры, отличающиеся друг от друга размерами, формой, показателями преломления, коэффициентом поглощения, коэффициентом отражения и т.д. Для получения изображения, по которому можно судить об их свойствах и сравнивать структуры между собой, исследователь должен быть уверен, что эти структуры находятся в одинаковых условиях, связанных с освещением и построением изображения оптической системой. В связи с этим к осветительной системе предъявляются следующие требования:

- равномерная освещенность поля зрения;
- необходимый уровень освещенности поля зрения;
- заполнение апертуры объектива;
- согласование осветительной и наблюдательной и/или фотометрической систем микроскопа.

При использовании в осветительной системе внешнего источника света необходимо учитывать то, что он и его блок питания часто выделяют нежелательную тепловую энергию. В связи с этим, а также по конструктивным соображениям, источник света нецелесообразно устанавливать в непосредственной близости от препарата или поверхности оптической детали, например, линзы конденсора.

Условно способы освещения можно разделить на три группы:

1. Освещение рассеянным светом.
2. Критическое освещение.
3. Освещение по методу Кёлера.

1.1. Освещение рассеянным светом

Микроскоп работает совместно с глазом, увеличивая разрешающую способность системы микроскоп-глаз, т.е. микроскоп «вооружает глаз». Однако восприятие цвета по-прежнему остается психофизической характеристикой глаза, которая проявляется при воздействии света различного спектрального состава и яркости на зрительный анализатор. Освещение препарата рассеянным солнечным светом позволяет глазу оценивать естественные для него цветовые соотношения объекта. Это освещение часто используется в упрощенных моделях микроскопа (рис. 1.1.).



Рис.1.1. Микроскоп Биолом С3 фирмы ЛОМО.

Бинокулярный биологический микроскоп Биолом С3 предназначен для учащихся и студентов, проводящих исследования прозрачных препаратов в проходящем свете в светлом поле при увеличении от 84 до 1350 крат.

Излучение естественного, протяженного источника солнечного света, например участка неба, направляют на препарат с помощью поворотного зеркала, находящегося под столиком микроскопа. Однако яркость такого источника, а, следовательно, и уровень освещенности препарата, зависят от времени суток, метеорологических и других условий.

Освещение рассеянным светом применяется в полевых условиях, а также в случаях, когда необходимо наблюдать естественные для глаз цветовые соотношения объекта. Этот тип освещения относится к широкопольным.

1.2. Критическое освещение

При критическом освещении изображение светящегося тела источника проектируется в плоскость препарата. Для выполнения перечисленных требований к осветительной системе необходимы источники с равномерно светящимся телом, например, ленточные лампы, но такие лампы применяются редко. Оптическая система, проектирующая изображение тела источника света, рассчитывается таким образом, чтобы пучки лучей заполнили апертуру объектива. Критическое освещение применяют в конфокальных микроскопах, но в этом случае оно не является широкопольным.

1.3. Освещение по методу Кёлера

Освещение по Кёлеру позволяет создать равномерное освещение объекта по всему полю зрения даже при использовании источников с неравномерно светящимся телом сложной формы, например, в виде спирали лампы накаливания.

Рассмотрим метод более подробно. По теории Аббе на разрешающую способность и подобие между несамосветящимся объектом и изображением влияет не только объектив, но и осветительная система.

В 1893 г. профессор Август Кёлер (рис. 1.2.), который сотрудничал с фирмой Карла Цейсса, опубликовал предписание по освещению препаратов. Он разработал систему освещения, позволявшую использовать разрешающую способность объективов, созданных Аббе, в частности, для микрофотографии [1, 3].

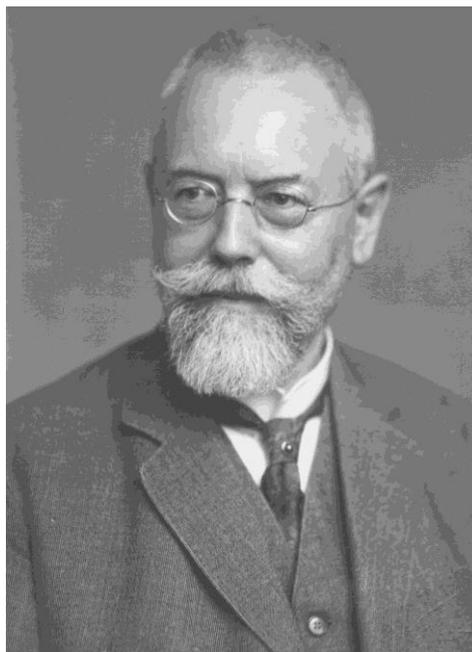


Рис. 1.2. Профессор Август Кёлер (August Köhler), 1866 – 1948 [4].

Введенный Кёлером метод давал возможность получать равномерное освещение по полю зрения, а также добиваться повышения разрешающей способности за счет применения специального конденсора. Правила настройки освещения актуальны и по сей день.

Освещение по Кёлеру относится к наиболее распространенному методу освещения световой микроскопии и относится к широкопольному типу освещения. Он применяется для настройки освещения как в проходящем, так и отраженном свете.

1.3.1. Освещение по Кёлеру в проходящем свете

На рис. 1.3. представлена оптическая схема микроскопа проходящего света, состоящая из осветительной и визуальной систем. Осветительная система содержит источник 1, коллектор 2 с полевой диафрагмой 3 и конденсор 6 с апертурной диафрагмой 5. В состав визуальной системы входят объектив 8 и окуляр 9.

В осветительной системе коллектор 2 располагается в непосредственной близости к источнику света 1 и формирует увеличенное изображение светящегося тела в плоскости апертурной диафрагмы 5 конденсора 6. Выбор параметров оптической системы коллектора зависит от размера светящегося тела источника света и его габаритов, а также от расстояния до апертурной диафрагмы 5 и ее диаметра [1].

Конденсор находится вблизи препарата 10 и служит для его освещения лучами с апертурой, соответствующей апертуре объектива 8. Конденсор состоит из оптической системы 6 и ирисовой диафрагмы 5, находящейся в ее передней фокальной плоскости. Линза 6 проектирует уменьшенное изображение полевой диафрагмы 3 в плоскость предмета 7. В настоящее время в исследовательских моделях применяются конденсоры с числовой апертурой до 1,4.

Оптическая схема микроскопа относится к центрированному типу оптических систем, поэтому децентрировка основных оптических компонентов приводит к потере качества изображения [1]. Отсюда следует, что при правильной настройке оптические оси всех компонентов должны находиться на общей оси симметрии, т.е. на оптической оси микроскопа, а центры диафрагм также должны находиться на этой оптической оси¹. Центрировка полевой и апертурной диафрагм осуществляется с помощью специальных юстировочных подвижек.

Для согласования осветительной и визуальной оптических систем микроскопа настройку производят в определенной последовательности.

¹ *Центрированная оптическая система* — это оптическая система, которая имеет ось симметрии (оптическую ось) и сохраняет все свои свойства при вращении вокруг этой оси [5].

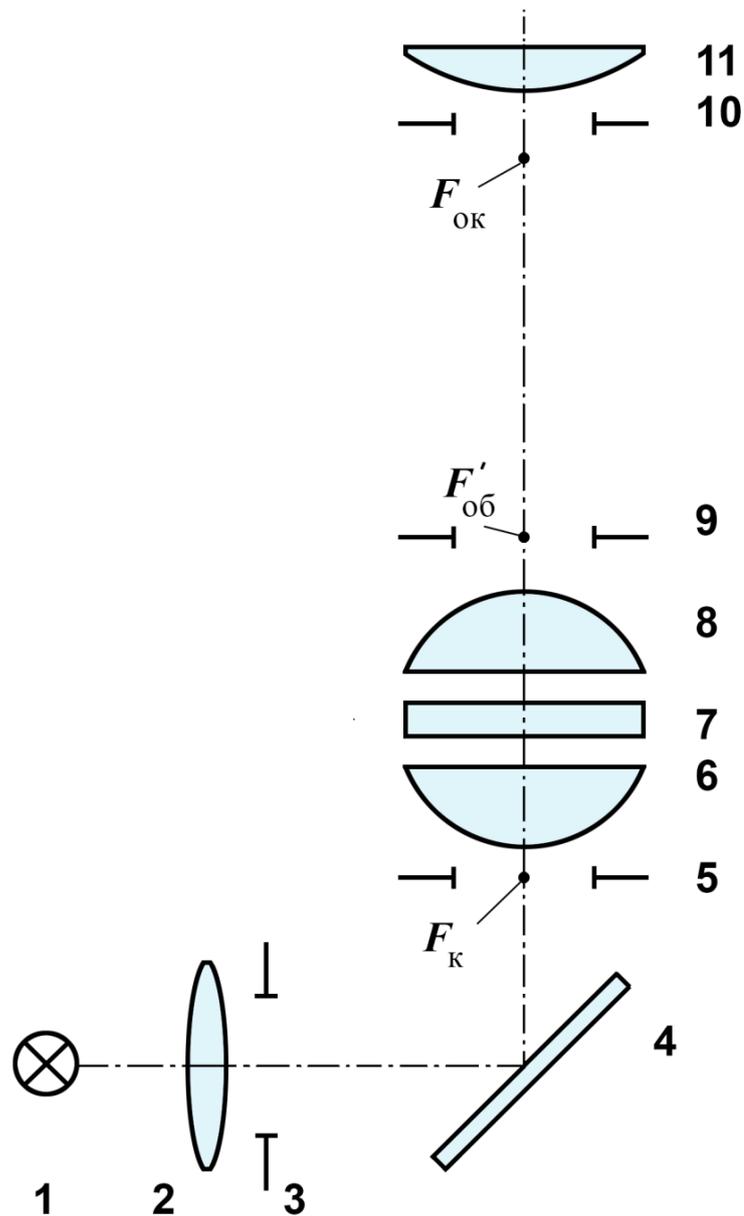


Рис. 1.3. Оптическая схема микроскопа проходящего света.

1 – источник света (лампа накаливания), 2 – коллектор, 3 – полевая диафрагма, 4 – поворотное зеркало, 5 – апертурная диафрагма конденсора, 6 – конденсор, 7 – препарат; 8 – объектив, 9 – апертурная диафрагма объектива; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – окуляр.

$F_{\text{к}}$ – фокус конденсора; $F'_{\text{об}}$ – фокус объектива; $F_{\text{ок}}$ – фокус окуляра.

Настройку микроскопа производят в три этапа.

1. С помощью визуальной системы 8–11 получают изображение объекта на препарате 7. Объектив 8 создает перевернутое и увеличенное действительное изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы 10. Это изображение рассматривают через окуляр 11, который работает как лупа, т.е. он создает прямое увеличение и

мнимое изображение объекта на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм [1].

- Систему конденсора 5–6 перемещают вдоль оптической оси до получения резкого изображения полевой диафрагмы 3 в плоскости объекта 7. В результате в плоскости полевой диафрагмы 10 одновременно резко должны быть видны изображения объекта 7 и полевой диафрагмы 3. Для наглядности на рис. 1.4. представлена последовательность настройки изображений.

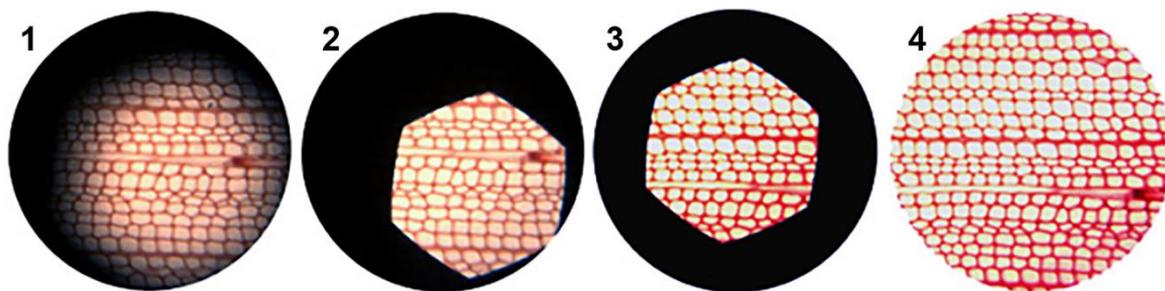


Рис. 1.4. Последовательность настройки изображений объекта и полевых диафрагм [6].

- получено резкое изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы окуляра;
- получены одновременно резкие изображения полевой диафрагмы коллектора и объекта в плоскости полевой диафрагмы окуляра (ирисовая диафрагма коллектора немного затянута);
- резкие изображения объекта и полевой диафрагмы центрированы относительно полевой диафрагмы окуляра;
- диафрагма коллектора раскрыта до размера полевой диафрагмы окуляра.

- Для настройки изображений источника света и апертурных диафрагм используются либо вспомогательный микроскоп, вставленный вместо окуляра, либо окуляр с линзой Бертрана, либо наблюдение осуществляется просто глазом при вынутом окуляре. На рис. 1.5. представлена последовательность настройки изображения источника света и апертурных диафрагм объектива и конденсора.

После выполнения всех этапов настройки будет видно четкое изображение объекта на равномерно освещенном поле, ограниченном полевой диафрагмой окуляра. Со зрачком 9 объектива 8 (рис. 1.3) сопряжены плоскости, связанные с источником 1, апертурной диафрагмой 5 конденсора 6 и зрачком глаза. Общее увеличение микроскопа Γ равно произведению действительного увеличения объектива $V_{об.}$ на видимое увеличение окуляра $\Gamma_{ок.}$:

$$\Gamma = V_{об.} \cdot \Gamma_{ок.} .$$

При наблюдении в микроскоп зрачок глаза оказывается совмещенным с выходным зрачком микроскопа. Диаметр выходного зрачка микроскопа должен быть меньше диаметра зрачка глаза. В

результате в системе «микроскоп-глаз» зрачок глаза не ограничивает пучки лучей. Например, при использовании объектива 40×0,65 и окуляра 15 крат диаметр выходного зрачка микроскопа составляет 0,54 мм, а зрачок глаза 2 – 4 мм.

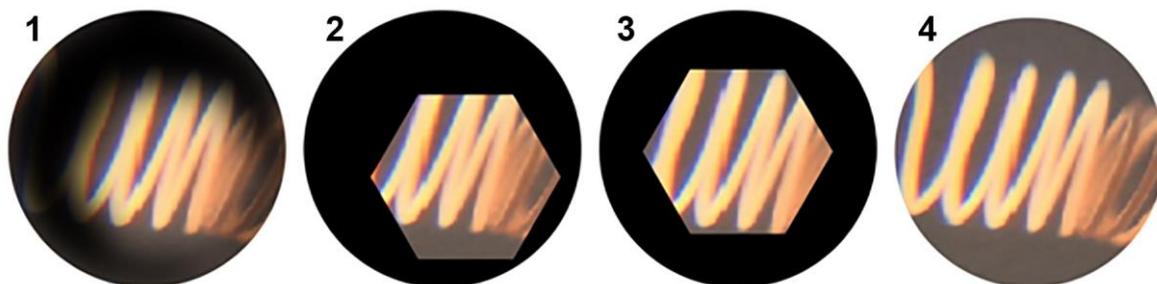


Рис. 1.5. Последовательность настройки изображений источника света и апертурных диафрагм.

- 1 – получено резкое изображение апертурной диафрагмы объектива с помощью вспомогательного микроскопа;
- 2 – получены одновременно резкие изображения нити лампы и апертурной диафрагмы конденсора (ирисовая диафрагма конденсора слегка затянута);
- 3 – апертурные диафрагмы конденсора и объектива центрированы;
- 4 – диафрагма конденсора открыта до размера апертурной диафрагмы объектива.

Этот метод настройки часто называют методом светлого поля в проходящем свете. Он используется для исследования прозрачных объектов с включенными в них поглощающими структурами. Абсорбирующая структура на пути пучка света частично поглощает его, частично рассеивает, вследствие чего амплитуда света, прошедшего через частицу, будет меньше, и частица выйдет на светлом фоне более темной. Контраст изображения объекта тем больше, чем большим поглощением обладает абсорбирующая структура [7].

1.3.2. Освещение по Кёлеру в отраженном свете

Освещение по Кёлеру в отраженном свете называют также методом светлого поля в отраженном свете, а само устройство – опак-иллюминатором.

На рис. 1.6. представлен вариант принципиальной схемы опак-иллюминатора. Освещение по Кёлеру осуществляется следующим образом. Коллектор 2 проецирует изображение светящегося тела источника 1 в плоскость ирисовой апертурной диафрагмы 4, которая линзой 6 изображается в плоскости выходного зрачка 8 объектива 9. Линза 3 проецирует оправу коллектора 2 в плоскость ирисовой полевой диафрагмы 5. Линза 6 и объектив 9 проецируют изображение полевой диафрагмы 5 в плоскость препарата 10 с помощью наклонной полупрозрачной пластинки 7 (или светоделительного кубика 11).

Пластинка 7 имеет полупрозрачное покрытие. Она часть светового пучка от источника 1 направляет в объектив для освещения поверхности объекта 10 (другая часть проходит через пластинку и не участвует в освещении объекта). Отраженный от поверхности объекта свет попадает в объектив 9, который формирует его изображение в плоскости полевой диафрагмы окуляра (на рисунке окуляр не показан). Таким образом, освещение препарата производится сверху через объектив, который одновременно играет роль и объектива, и конденсора.

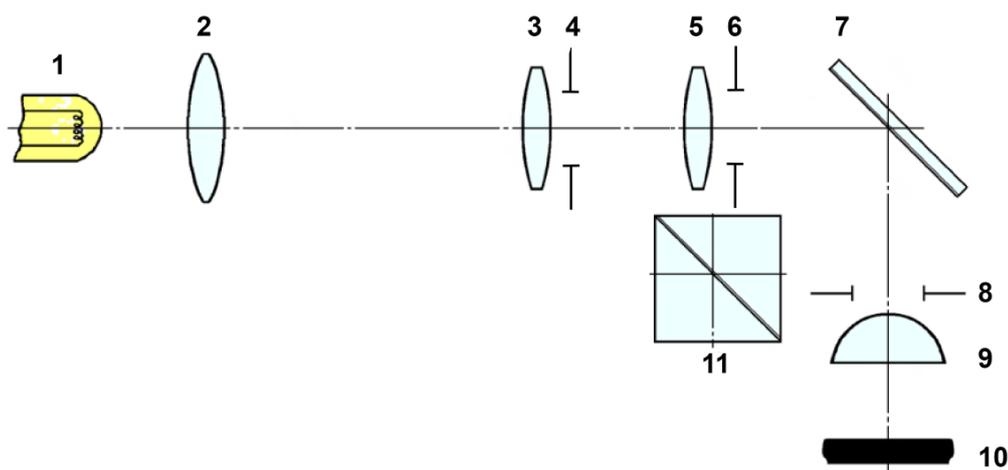


Рис. 1.6. Принципиальная схема опак-иллюминатора.

1 - источник света; 2 – коллектор; 3 - линза; 4 – апертурная диафрагма; 5 – линза; 6 – полевая диафрагма; 7 – светоделительная пластинка; 8 – зрачок объектива; 9 – объектив; 10 – объект; 11 – светоделительный кубик.

Микроскоп отраженного света применяют для наблюдения непрозрачных объектов, например, шлифов металлических сплавов, рудных минералов, кристаллических структур и т.п.

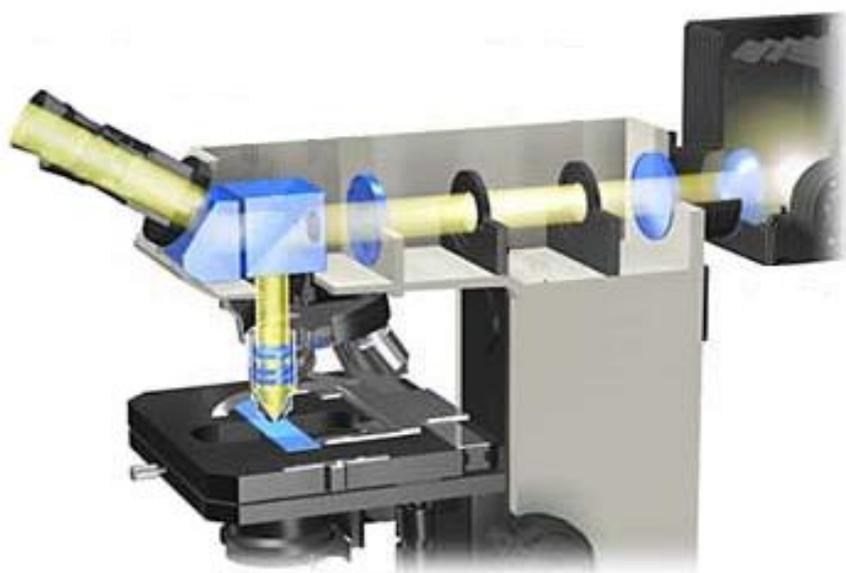


Рис. 1.7. Микроскоп отраженного света в разрезе [3].

Структура препарата видна вследствие различия отражательной способности его элементов. На рис. 1.7. представлен микроскоп отраженного света в разрезе. Источник света расположен в корпусе фонаря. Свет от источника проходит через коллектор, апертурную и полевую диафрагмы и направляется на светоделительный кубик. После отражения от полупрозрачной поверхности кубика свет направляется в объектив для освещения образца. Отраженный от его поверхности свет вновь попадает в объектив и направляется им в бинокулярную насадку.

1.4. Источники света

Современные микроскопы обычно имеют встроенный источник света с встроенным или внешним блоком питания. К основным параметрам, по которым выбирают источники света, относятся:

- спектральный состав излучения;
- яркость;
- размер светящегося тела;
- срок службы.

По спектральному составу различают источники со сплошным спектром, линейчатым и смешанным. Для работы в видимой области спектра в основном используют лампы накаливания и ксеноновые лампы, в УФ области применяют ксеноновые, ртутные лампы и светодиоды. Спектры излучения ртутной лампы и светодиодов в основном состоят из одной или нескольких полос или линий, а потому пригодны для исследований в фиксированных длинах волн.

Лампы, излучающие в одной и той же области, различаются по яркости, которая является важной характеристикой источника света. От нее зависит возможность фотометрирования предельно малых участков объекта.

Размер светящегося тела лампы должен удовлетворять следующему условию:

$$l_{\text{ист}} \geq \frac{A_{\text{об}} l}{A_{\text{кол}}},$$

где $A_{\text{об}}$ и $A_{\text{кол}}$ – апертуры объектива и коллектора, $l_{\text{ист}}$ и l – размеры источника и освещаемого поля в плоскости препарата. Размер светящегося тела выбирают в пределах 1 – 3 мм. Значительное превышение этих размеров тела нецелесообразно, так как увеличивает потребляемую мощность от источника питания, приводит к дополнительному нагреву и неоправданно большим размерам осветительного устройства.

Последний параметр – срок службы лампы – особых пояснений не требует.

1.4.1. Лампы накаливания

Наиболее распространенными источниками света в микроскопии являются лампы накаливания. Они просты в эксплуатации, стоят недорого и легко поддаются стабилизации. На рис. 1.8. представлены вольфрамовые лампы, отличающиеся друг от друга формой колбы и телом накала, креплением, потребляемой мощностью, сроком службы и некоторыми другими параметрами.

Все нагретые тела испускают лучистую энергию. Спектр теплового излучения рассчитывают применительно к так называемому абсолютно черному телу (АЧТ), свойства которого зависят исключительно от его температуры (T). Результаты таких расчетов переносят на реальные тела с поправкой, зависящей от материала излучателя. Для определения спектральной яркости какого-либо излучателя при заданной температуре умножают соответствующую яркость АЧТ на коэффициент излучения $\alpha(\lambda, T)$, специфичный для данного материала излучателя (для АЧТ $\alpha = 1$ независимо от температуры и длины волны; для всех нечерных излучателей $\alpha < 1$).

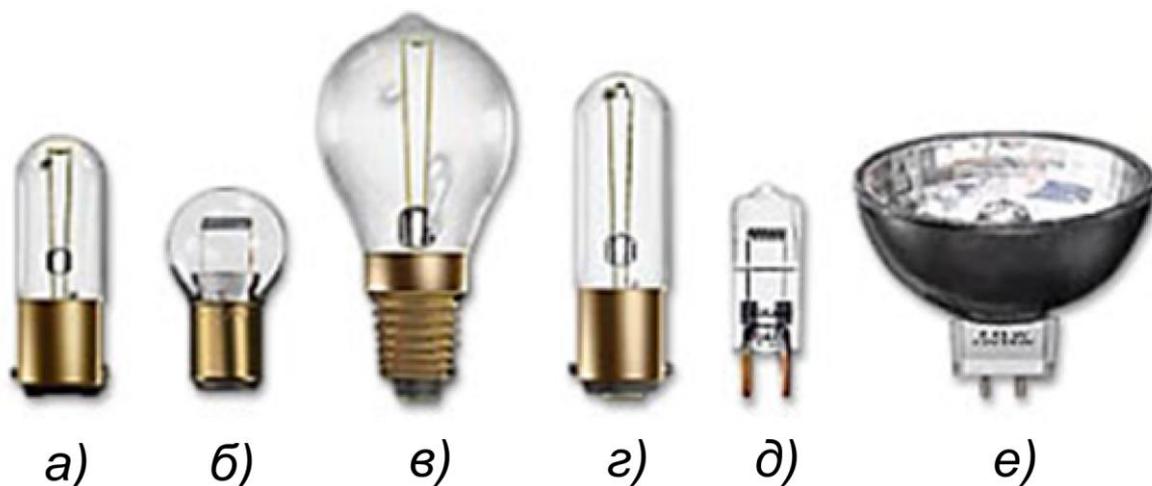


Рис. 1.8. Лампы накаливания, применяемые в оптической микроскопии [3].

a, б и г – вольфрамовые лампы с байонетным креплением; *в* – вольфрамовая лампа с резьбовым креплением; *д* – вольфрамо-галогенная лампа; *е* – вольфрамо-галогенная лампа с отражателем.

На рис. 1.9. представлен спектр излучения вольфрамовой нити при температуре 3000 К (кривая 2), характерной для большинства ламп накаливания. Кривая 2 получена в результате перемножения ординат кривой 1, соответствующей спектру АЧТ при $T = 3000$ К, и кривой 3, соответствующей коэффициенту излучения вольфрама. Видно, что особенности спектрального хода коэффициента 3 приводят к значительному снижению абсолютной яркости и небольшому

длинноволновому сдвигу спектра излучения лампы накаливания по сравнению со спектром АЧТ.

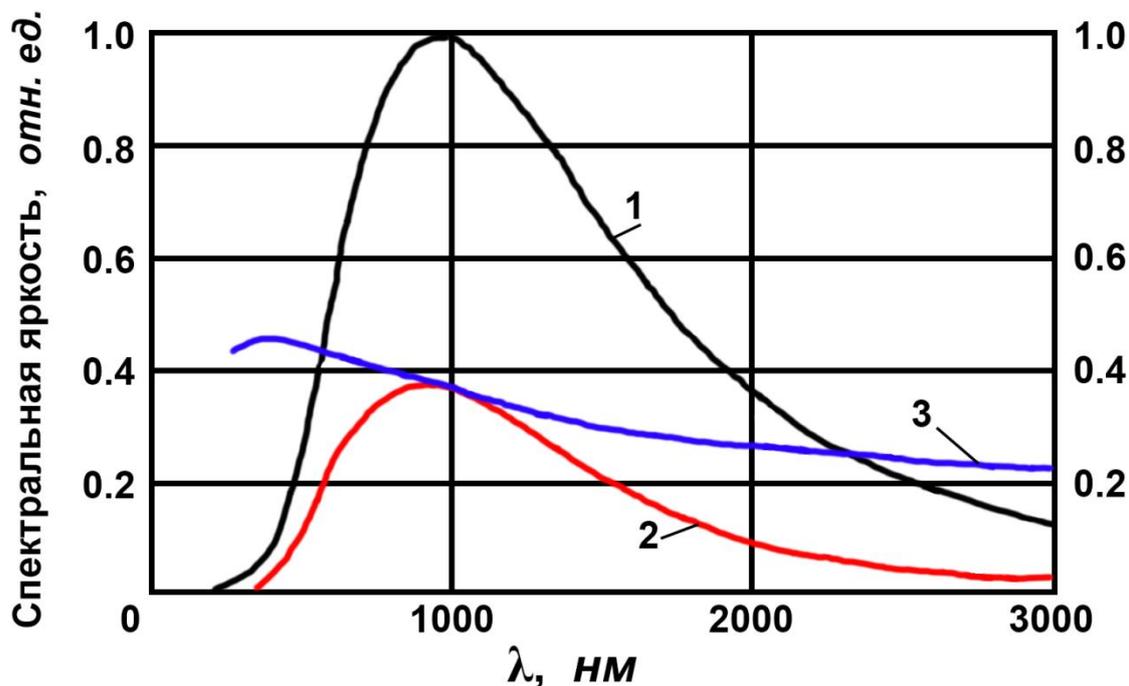


Рис 1.9. Спектральное распределение энергии в излучении абсолютно черного тела 1 и вольфрама 2, а также спектральный ход коэффициента излучения вольфрама 3 ($T = 3000$ К) [7].

Для характеристики любого нечерного излучателя, используя известные параметры АЧТ, вводят представления о цветовой и яркостной температурах [7]. Именно эти параметры обычно указывают в справочниках по лампам. Цветовая температура лампы (T_c) — это такая температура АЧТ, при которой спектр его излучения в видимой области практически не отличается от спектра лампы. Цветовая температура вольфрамовой нити несколько выше ее истинной температуры. Например, если нить нагрета до температуры 3000 К, то ее цветовая температура будет 3094 К. Яркостной температурой лампы (T_j) называют такую температуру АЧТ, при которой яркости обоих источников излучения на некоторой длине волны (обычно при 665 нм) совпадают. Яркостная температура существенно ниже истинной; в приведенном примере $T_j = 2678$ К.

Спектр излучения ламп накаливания в стеклянном баллоне лежит в пределах от 340 до 2000 нм, а в кварцевом баллоне распространяется в УФ область до 260 нм; при этом максимум находится вблизи 1000 нм. Основная доля энергии приходится на ИК область, небольшая часть — на видимую и совсем малая — на УФ область. С повышением температуры растет как общее излучение лампы, так и доля коротковолнового излучения (рис. 1.10).

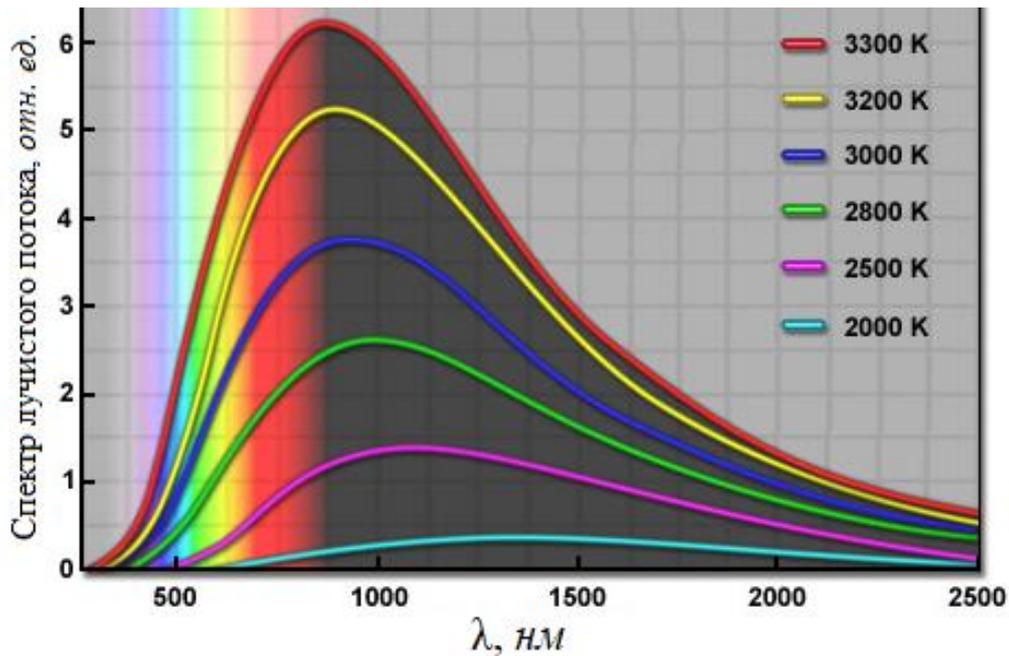


Рис. 1.10. Спектральное распределение энергии в излучении вольфрамо-галогенной лампы при различных цветовых температурах [3].

Этот пример еще раз убеждает, что основной характеристикой источника света для микроскопа является не световой поток, а яркость, которая в свою очередь зависит исключительно от температуры тела накала. Усредненная яркость, учитывающая структуру нити, называется *габаритной яркостью*. Эта величина входит во все энергетические расчеты.

Каждый тип ламп рассчитан на определенную температуру, которая у различных типов может быть от 2800 до 3300 К. Последняя приближается к температуре плавления вольфрама 3665 К.

Поднять температуру и тем самым яркость лампы накаливания можно, увеличив напряжение питания. Однако работа с перекалом увеличивает испарение вольфрама и существенно сокращает срок службы лампы. Поэтому форсировать режим горения лампы можно лишь на короткое время, в противном случае нужно иметь в запасе большое количество ламп.

Широкое распространение получили высокотемпературные лампы накаливания с галогенным циклом. Миниатюрность и высокая яркость делает их очень ценными для микроскопии. В лампах такого типа основной эффект достигается введением галогена (обычно йода) внутрь баллона. Участвуя в галогенном цикле, он устраняет почернение колбы и уменьшает испарение нити накала. Цветовая температура галогенных ламп достигает 3400 К. Для нормального протекания галогенного цикла требуется высокая температура стенок колбы, поэтому баллоны галогенных ламп изготавливают малого объема из тугоплавкого кварцевого стекла. Применение кварцевого стекла, благодаря его

прозрачности в УФ области, увеличивает долю коротковолнового излучения, что является дополнительным преимуществом.

1.4.2. Газоразрядные лампы

В газоразрядных источниках света используется излучение газов или паров металлов, возникающее под действием проходящего через них электрического тока.

В обычных условиях газы не проводят электрический ток, поскольку их атомы или молекулы электрически нейтральны. Однако, если к двум электродам, между которыми находится какой-либо газ, подводить увеличивающееся напряжение, то по достижении некоторого предельного значения, называемого *напряжением зажигания*, возникнет электрический разряд, который сопровождается излучением света. Возникновение разряда объясняется тем, что при напряжении зажигания отдельные, случайно образовавшиеся в газе электроны, разгоняются электрическим полем до таких энергий, при которых сами начинают ионизировать газ при столкновении с нейтральными частицами. Для поддержания разряда требуется напряжение меньше первоначального, которое называется *напряжением горения*.

В отличие от теплового излучения, имеющего непрерывный спектр, газовый разряд дает излучение преимущественно с линейчатым спектром, характерным для того газа или пара, в котором происходит разряд, хотя отдельные виды газового разряда могут давать излучение с непрерывным спектром.

В микроскопах чаще всего применяют ртутно-кварцевые и ксеноновые лампы сверхвысокого давления. Они имеют небольшую шарообразную колбу с двумя мощными электродами, расстояние между которыми мало. За счет этого достигается очень высокая яркость. На рис. 1.11. представлено изображение газоразрядной лампы.

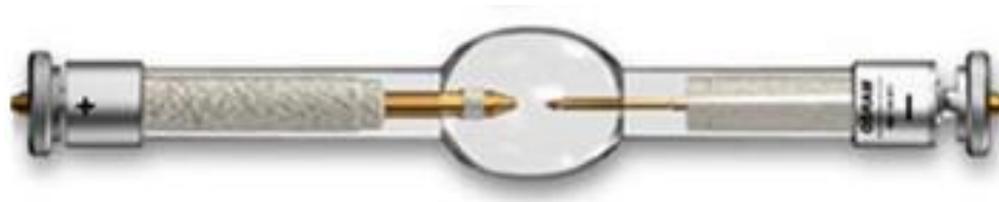


Рис. 1.11. Изображение газоразрядной лампы сверхвысокого давления [3].

Ртутные газоразрядные лампы сверхвысокого давления во много раз ярче ламп накаливания и могут обеспечивать интенсивное освещение в выбранных диапазонах длин волн во всей видимой области спектра в сочетании с соответствующими фильтрами. Эти источники широко используют в люминесцентной микроскопии. На рис. 1.12. представлен спектр излучения ртутной лампы.

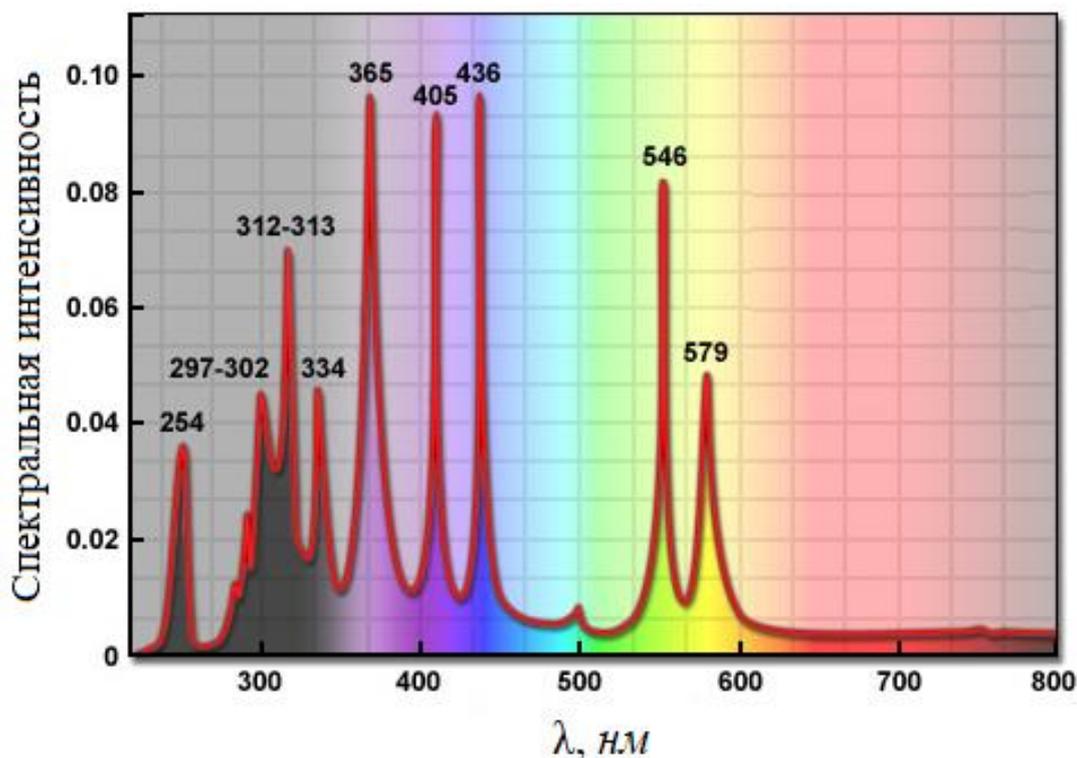


Рис.1.12. Спектр излучения ртутной лампы сверхвысокого давления [3].

Большая часть энергии УФ и видимого света распределена не равномерно по спектру, а сконцентрирована в спектральных линиях, между которыми имеется непрерывный фон (смешанный спектр). Область спектрального излучения от 600 до 1000 нм является относительно непрерывной и не более яркой, чем ксеноновые лампы, которые охватывают широкий спектральный диапазон с несколькими спектральными линиями в синей и ИК областях.

Наиболее популярными ртутными лампами для люминесцентной микроскопии являются НВО-100 и ДРШ-250-2 (ртутные газоразрядные лампы сверхвысокого давления мощностью 100 и 250 Вт). Сверхвысокое давление в лампах типа НВО и ДРШ отражается на ширине линий, на соотношении между интенсивностями линий, а также на величине фона, который в этих лампах сильно выражен.

В ксеноновых лампах сверхвысокого давления газовый разряд дает непрерывный спектр в видимой и УФ областях, а в ближней ИК области появляются линии, характерные для ксенона. Цветовая температура ксеноновых ламп около 6000 К. На рис. 1.13. представлен спектр ксеноновой лампы.

При работе с газоразрядными источниками следует иметь в виду, что УФ излучение вызывает ожоги кожи и глаз. Причем для глаз опасно даже рассеянное излучение. Поэтому конструкция фонаря лампы должна надежно защищать оператора от УФ излучения. Газоразрядные лампы сверхвысокого давления взрывоопасны, что следует учитывать при их

монтаже и эксплуатации. Это замечание касается прежде всего ксеноновых ламп, которые взрывоопасны даже в холодном состоянии.

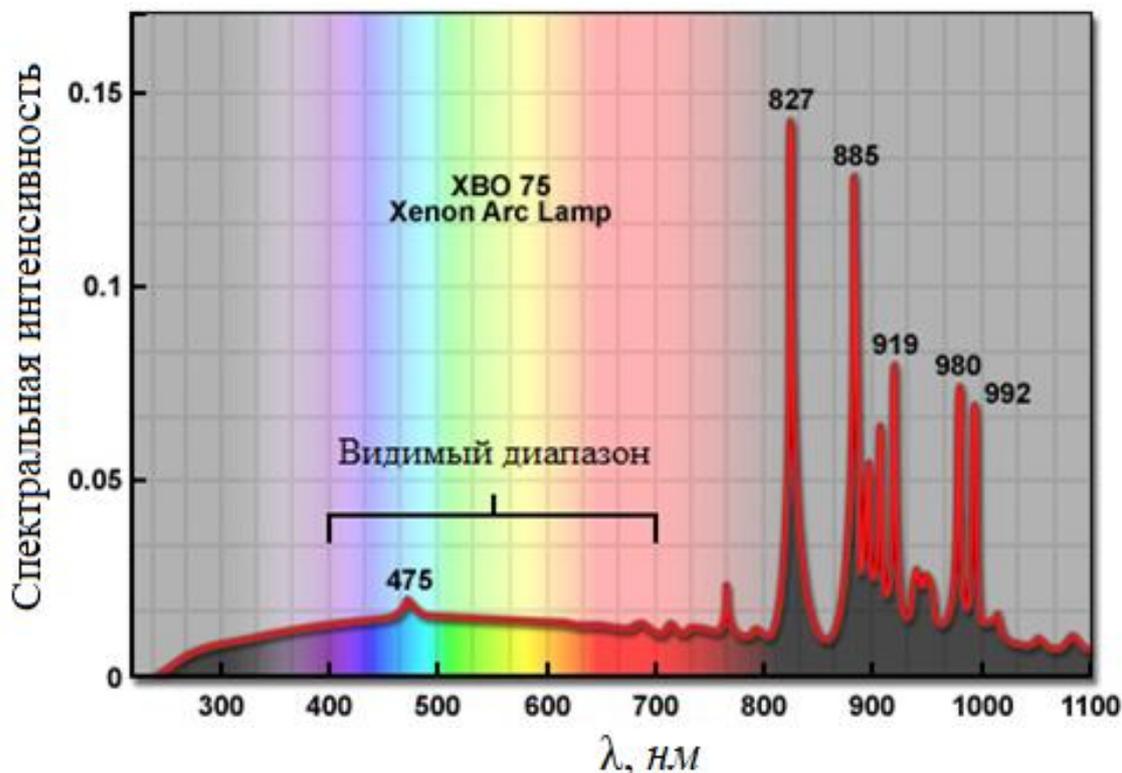


Рис. 1.13. Спектр ксеноновой газоразрядной лампы HBO 75 [3].

1.4.3. Светодиодные источники

Светодиоды (LED) – полупроводниковые устройства, являющиеся наиболее перспективными источниками света. Светодиоды обеспечивают спектральное разнообразие, позволяющее выбрать нужную длину волны для оптимального возбуждения флуорофоров, охватывающих УФ, видимую и ближнюю ИК области. Кроме того, новые мощные светодиоды генерируют достаточную яркость для обеспечения освещения в люминесцентной микроскопии. Полуширина спектра типичного квазимонохроматического светодиода варьируется от 20 до 70 нм (рис. 1.14.).

Спектр излучения светодиода гораздо шире спектра лазерного излучения. Современные тенденции развития светодиодов указывают на увеличение яркости во всех спектральных областях, что позволяет использовать их в качестве источника монохроматического света, имеющего низкую пространственную когерентность, в световой микроскопии. Полупроводниковые устройства являются прочными, компактными и могут работать в течение 100 000 часов или примерно в 500 раз дольше ртутной лампы типа HBO.

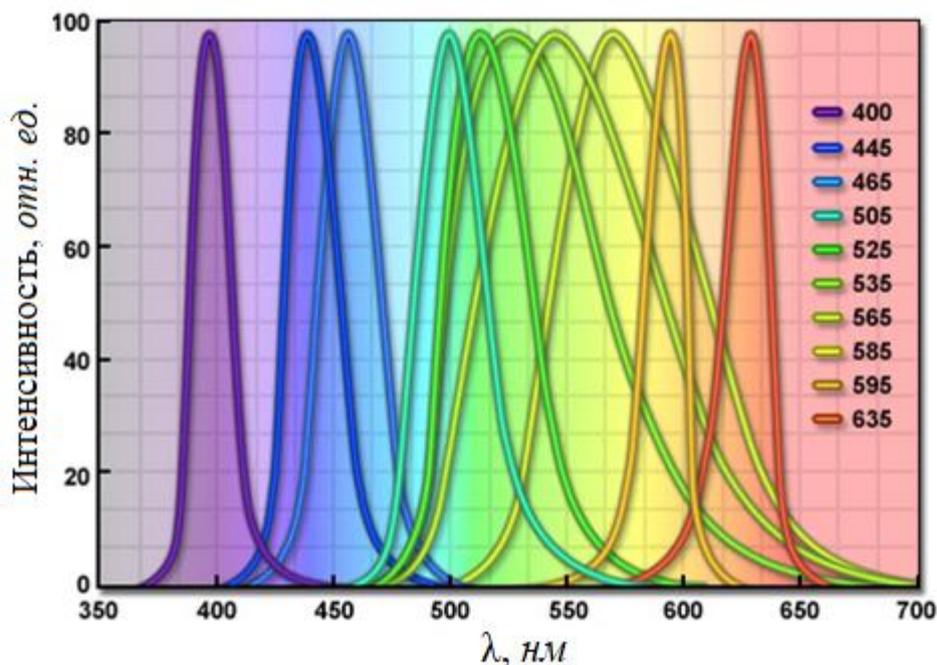


Рис. 1.14. Спектры (приведенные к единице) различных светодиодов, охватывающие видимую область [3].

Светодиоды белого света. Существует два основных подхода для получения белого света от устройств, которые в основном обладают узким спектром излучения. Один из методов основан на объединении трех диодов разных цветов (синий, зеленый, красный) в такой пропорции, чтобы выходной сигнал выглядел белым. Другой метод использует фиолетовый или ультрафиолетовый светодиод для обеспечения энергии, которая возбуждает вторичный люминофор, излучающий белый свет (рисунок 1.15 а). Выбор наилучшего цветового соотношения для оптической микроскопии должен основываться на технических характеристиках детектора и возможностях программного обеспечения.

Комбинация красного, зеленого и синего диодов позволяет генерировать белый свет или любой из цветов, используя схемы, которые управляют тремя диодами независимо друг от друга.

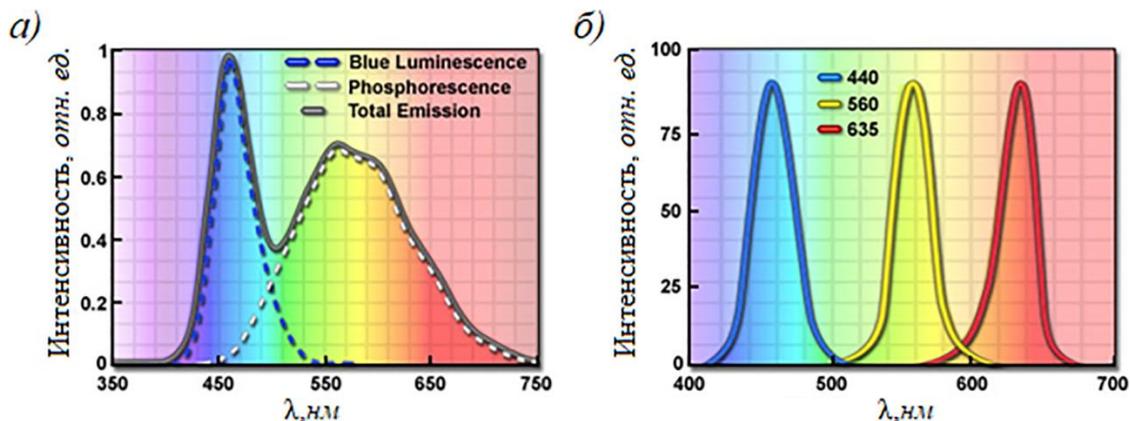


Рис. 1.15. Спектральные характеристики диодов белого света [3].

Заключение

В главе 1 рассмотрены различные методы освещения несамосветящихся объектов и типы источников света. Освещение по Кёлеру относится к основному методу, применяемому в световой микроскопии. В этом случае тело лампы и исследуемый объект можно рассматривать как два самостоятельных объекта. В результате оптическая схема микроскопа содержит две взаимосвязанные системы изображений источника света и объекта, которые находятся в определенных сопряженных плоскостях: изображение источника в апертурных диафрагмах, а объекта – в полевых.

Осветительная и визуальная части оптической системы микроскопа должны быть центрированными друг относительно друга. Размер апертурной диафрагмы определяется размером выходного зрачка объектива, а размер полевой зависит от размера полевой диафрагмы окуляра. При такой настройке и при условии равномерного заполнения световыми пучками апертуры достигают подобия и предела разрешения, соответствующих характеристикам используемых оптических компонентов (без учета aberrаций).

Необходимо помнить, что исследователь всегда стремится получить:

- 1) изображение, подобное объекту;
- 2) предельное значение разрешения;
- 3) приемлемый контраст изображения;
- 4) максимальный размер поля зрения.

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются принципиальные отличия критического метода освещения от освещения по Кёлеру?
2. По каким параметрам выбирают источники для световой микроскопии?

Глава 2. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. КОСОЕ ОСВЕЩЕНИЕ

Перед тем, как перейти к рассмотрению различных методов контрастирования, следует напомнить, что свет – это электромагнитное излучение, природа которого двойственна. В одних случаях свет проявляет себя как волна, в других ведет себя аналогично потоку частиц. Поэтому необходимо отдавать себе отчет в корпускулярно-волновой природе света. Когда свет поглощается, он часто трактуется как поток частиц (фотонов). При изучении процесса образования изображения в микроскопе, где основное значение имеют явления преломления, дифракции и интерференции, свет рассматривается как волновое движение [7]. Основные методы контрастирования связаны именно с волновыми представлениями, поэтому и поглощение будем рассматривать с точки зрения волновой оптики.

Структура любого объекта различима, если его частицы по-разному поглощают или отражают свет. Эти различия обуславливают разницу амплитуд световых волн, прошедших (или отраженных) через разные участки препарата, от чего, в свою очередь, зависит контраст изображения.

Контраст изображения характеризуется величиной:

$$k = \frac{E_{\text{ф}} - E_{\text{об}}}{E_{\text{ф}}}$$

где $E_{\text{ф}}$ – освещенность фона в плоскости изображения, $E_{\text{об}}$ – освещенность изображения объекта. Максимальный контраст ($k = 1$) наблюдают при полном поглощении света объектом ($E_{\text{об}} = 0$) в проходящем свете или при нулевом значении коэффициента отражения в отраженном свете,

При разработке теории образования изображения в микроскопе Аббе условно разделил все (несамосветящиеся) объекты на амплитудные и фазовые. Амплитудные объекты изменяют амплитуду прошедшего или отраженного света. Фазовые объекты вызывают относительное опережение или отставание по фазе волнового фронта. Это происходит во всех случаях, когда существует различие в показателях преломления объекта и среды, в которую он погружен. Фазовые объекты в светлом поле (в проходящем или отраженном свете) не видны.

На рис. 2.1. представлена схема для сравнения амплитудного и фазового объектов с точки зрения волновой теории света. Пусть через среду с показателем преломления $n_{\text{ср}}$ проходит световая волна, максимумы интенсивности которой обозначим цифрами 1, 2, 3, ... В эту среду, коэффициент поглощения которой равен нулю ($\eta_{\text{ср}} = 0$), погружены два объекта одинакового размера и формы, но с разными значениями показателя преломления и коэффициента поглощения.

Справа изображены поля зрения, наблюдаемые в микроскоп в проходящем свете. В первом случае прохождения волны через среду без объекта поле зрения представляет собой равномерно освещенное поле. Во втором случае волна проходит через амплитудный объект с коэффициентом поглощения $\eta_{об1}$ ($\eta_{об1} < 1$) и показателем преломления, равным показателю преломления среды ($n_{об1} = n_{ср}$). Прошедшая через объект толщиной t волна отличается от волны среды уменьшенной амплитудой без изменения фазы, при этом точки 2 и 3 не изменили своего положения. В поле зрения амплитудный объект выглядит более темным на светлом фоне среды, а контраст изображения $k < 1$. В третьем случае волна, прошедшая через фазовый объект, не меняет амплитуду, так как коэффициент поглощения объекта равен нулю ($\eta_{об1} = \eta_{ср} = 0$), но из-за отличия показателей преломления среды и фазового объекта возникает разность хода Δ , также зависящая от толщины объекта t :

$$\Delta = t (n_{об2} - n_{ср}).$$

При этом точки 2 и 3 изменили свое положение. Поле зрения представляет собой равномерно освещенное поле, как в первом случае, т.е. контраст изображения равен нулю ($k = 0$).

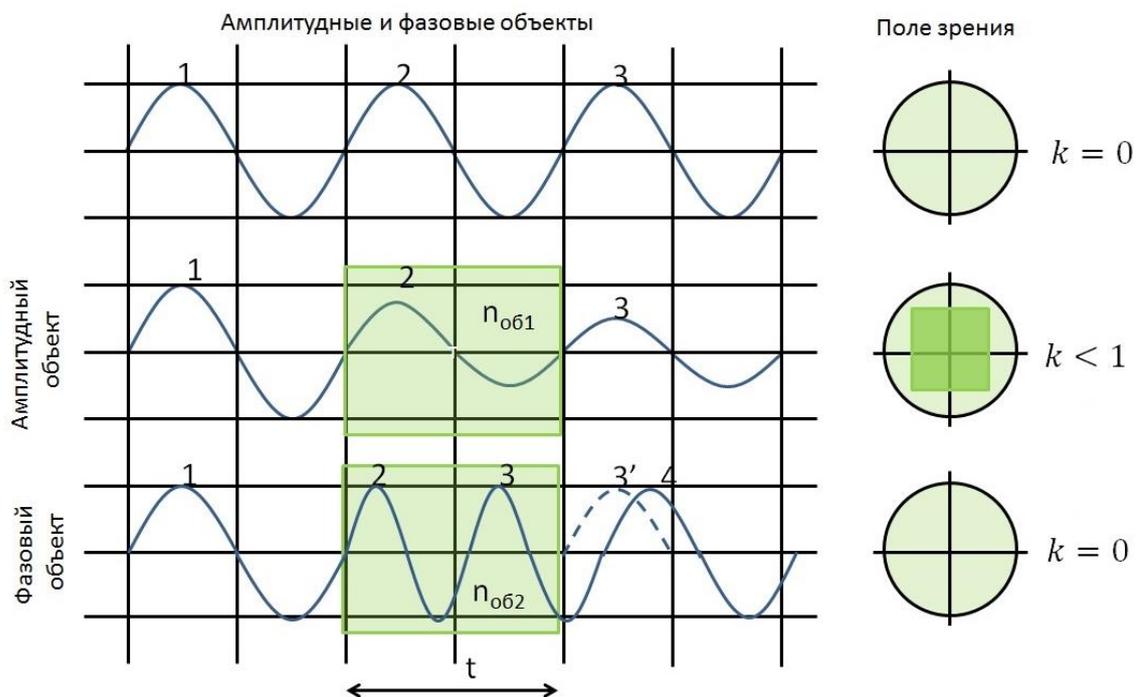


Рис. 2.1. Схема сравнения амплитудного и фазового объектов.

$n_{ср}$ – показатель преломления среды; $n_{об1}$ – показатель преломления амплитудного объекта; $n_{об2}$ – показатель преломления фазового объекта.

Реальные объекты, как правило, не являются чисто амплитудными или чисто фазовыми. Если амплитуда прошедшего через объект света

меняется незначительно, то такие объекты называют слабоконтрастными. Глаз, как и любой приемник излучения, реагирует только на изменение амплитуды и не реагирует на изменение фазы, поэтому для исследования слабоконтрастных и фазовых объектов применяют различные методы контрастирования. Основная задача этих методов – преобразование фазовых изменений в амплитудные для получения изображения приемлемого контраста. Эти преобразования осуществляются либо за счет воздействия на сам объект (например, окрашивание), либо за счет создания специальных методов освещения препарата. Однако из теории изображения Аббе следует, что разрешение и подобие изображения несамосветящегося объекта зависят от количества спектральных порядков, пропущенных объективом. Оптимальное значение этих параметров достигается при равенстве апертур осветительной системы и объектива при условии равномерного освещения апертурной диафрагмы конденсора, т.е. при ее полном и равномерном заполнении. Применение специальных методов освещения может приводить к некоторой потере разрешения и подобия по сравнению с настройкой освещения по Кёлеру. Отсюда следует, что при выборе метода контрастирования исследователь должен понимать и принять необходимость некоторого компромисса. Ему часто приходится балансировать между выбором максимального разрешения, подобия и контраста.

Небольшое повышение контраста можно получить за счет уменьшения диаметра апертурной диафрагмы конденсора. Контраст увеличивается из-за уменьшения рассеянного света, вызванного aberrациями на краю линз, и повышения уровня частичной когерентности. Однако при сильном диафрагмировании конденсора понижается разрешающая способность микроскопа.

К основным методам контрастирования, осуществляемым за счет осветительной системы микроскопа, относятся:

- метод косо́го освещения;
- метод темного поля;
- метод фазового контраста;
- метод дифференциально-интерференционного контраста (ДИК).

На самом деле количество методов контрастирования за счет осветительной системы больше перечисленных. Однако часто они являются различными модификациями и комбинациями основных методов контрастирования. Для реализации этих основных методов используются различные виды диафрагм и оптических вставок. Диафрагмы различаются формой и конструкцией: ирисовая, кольцевая, щелевая и др. Существенное значение имеют не только форма, но и место установки диафрагм. В основном диафрагмы и вставки располагаются в оптически сопряженных плоскостях, а именно в плоскостях апертурных

диафрагм конденсора и объектива (в выходном зрачке объектива) [8]. Напоминаем, что при настройке освещения по Кёлеру в выходном зрачке объектива формируется изображение апертурной диафрагмы конденсора.

2.1. Метод косого освещения

Метод косого освещения применяют для исследования малоконтрастных объектов, например прозрачных живых клеток. Косое освещение позволяет выявлять объекты, отличающиеся от среды показателем преломления (фазовые объекты). С исторической точки зрения этот метод можно отнести к наиболее ранним методам контрастирования. Он подразделяется на два вида: метод косого симметричного освещения и метод косого несимметричного освещения.

В некоторых случаях метод позволяет выявить «рельефность» объекта за счёт образования «теней». Косое освещение хотя и дает возможность подчеркнуть контраст объекта, но не обеспечивает точного соответствия изображения объекту, т.е. его подобия.

2.1.1. Метод косого симметричного освещения

Метод косого симметричного освещения реализуют с помощью установки в фокальную плоскость конденсора непрозрачной диафрагмы с прорезью симметричной формы, например, в виде кольца (рис. 2.2.).



Рис. 2.2. Держатель конденсора с кольцевыми вставками различного диаметра [8].

Уменьшенное изображение этого кольца наблюдают в выходном зрачке объектива. Метод позволяет выделять границы очертания объекта с различной геометрической ориентацией. В литературе для этого метода

освещения встречаются различные названия: косое симметричное освещение, круговое косое освещение, освещение полым конусом, краевое кольцевое освещение [8].

2.1.2. Метод косого несимметричного освещения

Для реализации метода косого несимметричного освещения применяют специальные диафрагмы несимметричной формы (рис.2.3.). Изображение апертурной диафрагмы формируется в выходном зрачке объектива. При этом объект освещается косым пучком лучей света, в результате чего изображение становится более рельефным и контрастным. Выбор формы несимметричной диафрагмы или величина смещения ирисовой диафрагмы зависит от формы и размера структур объекта, например, вытянутых и ориентированных в определенном направлении. Вращая диафрагму относительно объекта, добиваются получения наиболее контрастного его изображения.

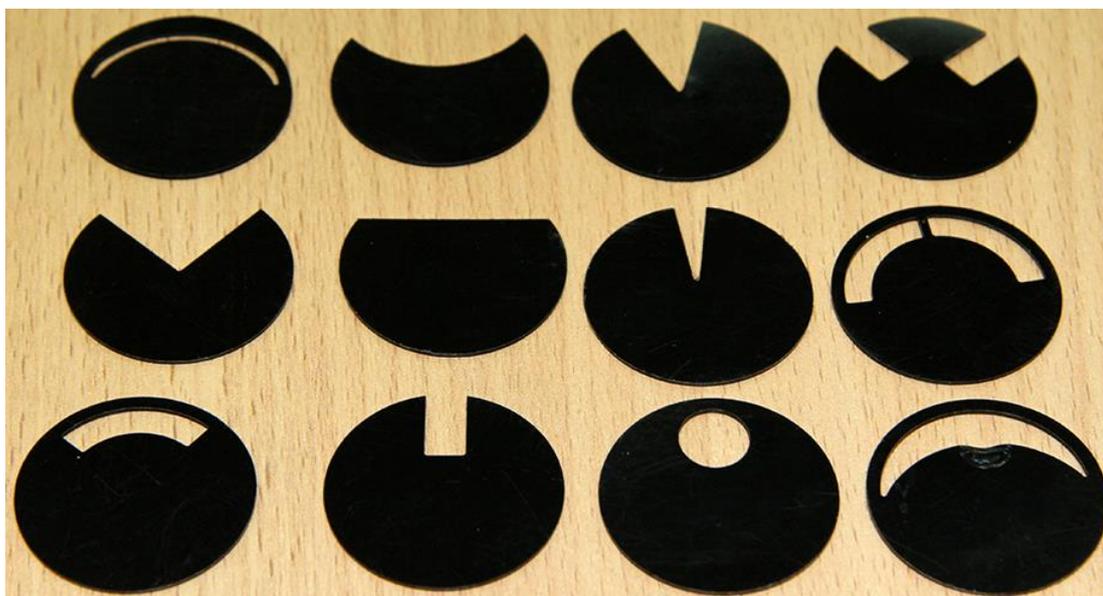


Рис. 2.3. Диски различной формы для реализации несимметричного косого освещения, помещаемые в плоскость апертурной диафрагмы конденсор [9].

На рис. 2.4. представлен конденсор ОИ-14 (фирма ЛОМО) для реализации косого освещения. Конденсор состоит из неподвижной оптической системы и вращающейся вокруг оси передвижной ирисовой апертурной диафрагмы. На вращающейся части конденсора нанесены индекс и шкала. Для реализации косого освещения смещают ирисовую диафрагму с помощью реечного механизма, позволяющего отклонять положение диафрагмы на 10 мм вправо или влево от оптической оси микроскопа. При совмещении штриха индекса с нулевым штрихом шкалы центр диафрагмы находится на оптической оси конденсора, что необходимо для настройки освещения по Кёлеру. Смещение диафрагмы

приводит к перемещению нулевого порядка спектра к периферии выходного зрачка объектива, а вращение – к ориентации этого смещения.

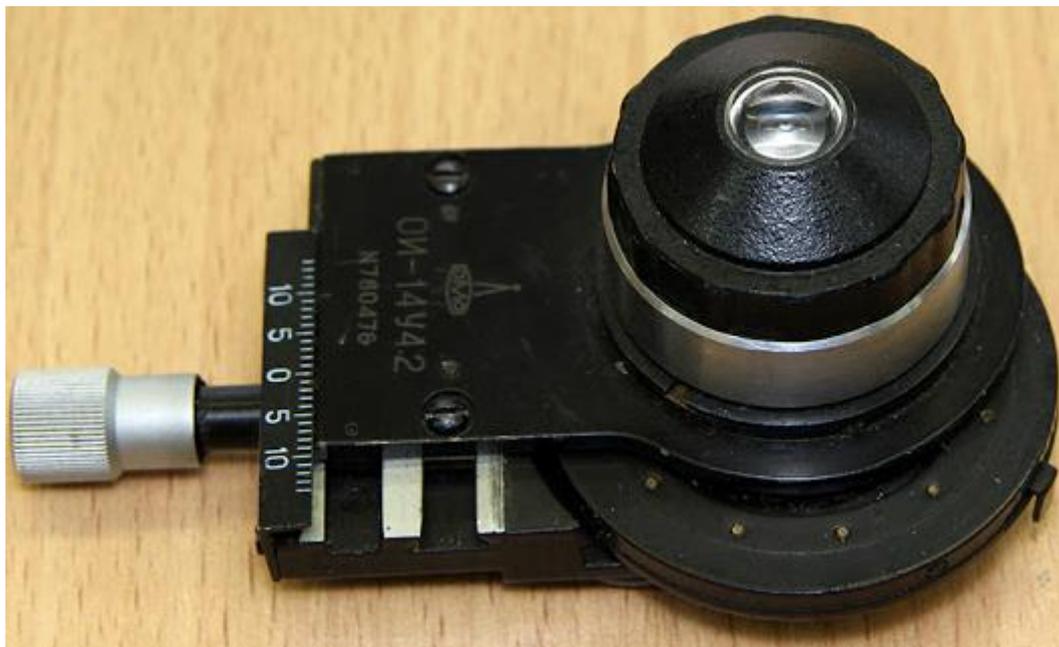


Рис. 2.4. Конденсор ОИ-14 (фирма ЛОМО), предназначенный для прямого и несимметричного косоого освещения [9].

Заключение

Метод косоого освещения относится к наиболее ранним методам контрастирования, его автор остался неизвестным. Тем не менее, метод применяется и в настоящее время, так как не требует разработки специальных оптических устройств и не вызывает трудностей в настройке и эксплуатации.

Контрольные вопросы

1. На какие две группы Аббе условно разделил объекты микроскопии и по каким параметрам? В чем заключается отличие их изображений?
2. В чем заключается метод косоого освещения и какие структуры он позволяет визуализировать?

Глава 3. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ТЕМНОЕ ПОЛЕ

Метод темного поля представляет собой специальную технику освещения препарата для наблюдения малых рассеивающих частиц, отличающихся от среды показателем преломления, и границ более крупных структур, вдоль которых также резко меняется показатель преломления. В светлом поле эти частицы и границы изображаются недостаточно четко или даже не заметны, однако рассеянный ими свет уменьшает общий контраст изображения. Для выявления малых рассеивающих частиц и получения более контрастных границ необходимо создать такое освещение препарата, которое позволит каким-то способом удалить лучи, участвующие в геометрическом построении изображения в светлом поле, но при этом визуализировать рассеивающие частицы и границы.

Для понимания механизма получения изображения в темном поле рассмотрим примерный характер индикатрис рассеяния для частиц разного размера (рис. 3.1.). Вокруг малой частицы размером около $0,1\lambda$ рассеянный свет распределяется почти равномерно по всем направлениям (рэлеевское рассеяние). При увеличении размера частицы, например, до $0,5\lambda$, распределение света становится асимметричным. Для частиц размером около 2λ основная энергия идет в направлении геометрического луча. На частицах, по размеру значительно превышающих длину волны, свет преломляется и отражается по законам геометрической оптики [7].

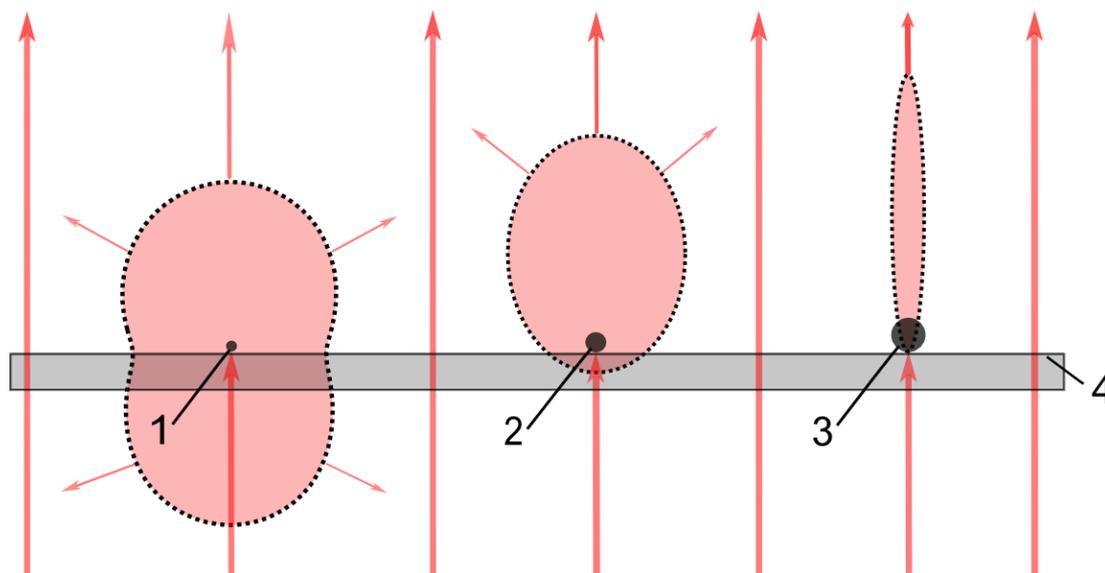


Рис. 3.1. Индикатрисы рассеяния света на частицах разных размеров: $0,1\lambda$ (1), $0,5\lambda$ (2), 2λ (3), 4 - поверхность предметного стекла.

Темнопольное освещение представляет собой разновидность симметричного косо́го освещения, в котором диаметр осветительного

кольца превышает диаметр апертурной диафрагмы объектива. В результате геометрические лучи, заполняющие апертуру объектива в светлом поле, блокируются и не попадают в объектив. Косые лучи, освещающие объект под большими углами, рассеиваются на малых частицах и границах и попадают в объектив для формирования их изображений на темном фоне.

Метод темнопольного освещения требует специальных приспособлений и соблюдения определенного соотношения апертур осветительной и визуальной систем микроскопа.

3.1. Метод темного поля в проходящем свете

Для осуществления темнопольного освещения в проходящем свете используют обычные объективы и темнопольные конденсоры. Применяют либо темнопольные конденсоры специальной конструкции, либо светлопольные конденсоры с кольцевыми вставками.

На рис. 3.2. представлены оптическая схема и внешний вид специального темнопольного иммерсионного конденсора кардиоидного типа. Конденсор-кардиоид устанавливают вместо конденсора светлого поля.



Рис. 3.2. Схема (слева) и внешний вид (справа) специального темнопольного конденсора ОИ-13 производства ЛОМО [10]

1 - сферическое зеркало, 2 - линза-кардиоид, 3 – оправа, 4 – цилиндр, 5 – корпус, 6 – юстировочные винты.

Сферическое зеркало 1 и линза-кардиоид 2 представляют собой склейку, которая крепится в оправе 3. Оправа размещается в цилиндре 4 и закрепляется в корпусе 5. При помощи юстировочных винтов 6 конденсор центрируют относительно объектива. При настройке освещения на верхнюю поверхность линзы 2 наносят иммерсионное масло. Нижнюю поверхность предметного стекла (на рисунке не показано) приводят в соприкосновение с масляной иммерсией. При подготовке препарата следует обращать внимание на отсутствие

дефектов у предметных и покровных стекол (царапин, загрязнений и т.п.), а также наличие пузырьков в среде и иммерсионном масле.

На рис. 3.3. представлены объектив, конденсор-кардиоид и ход лучей в них. В объектив попадает только свет, рассеянный структурами объекта.

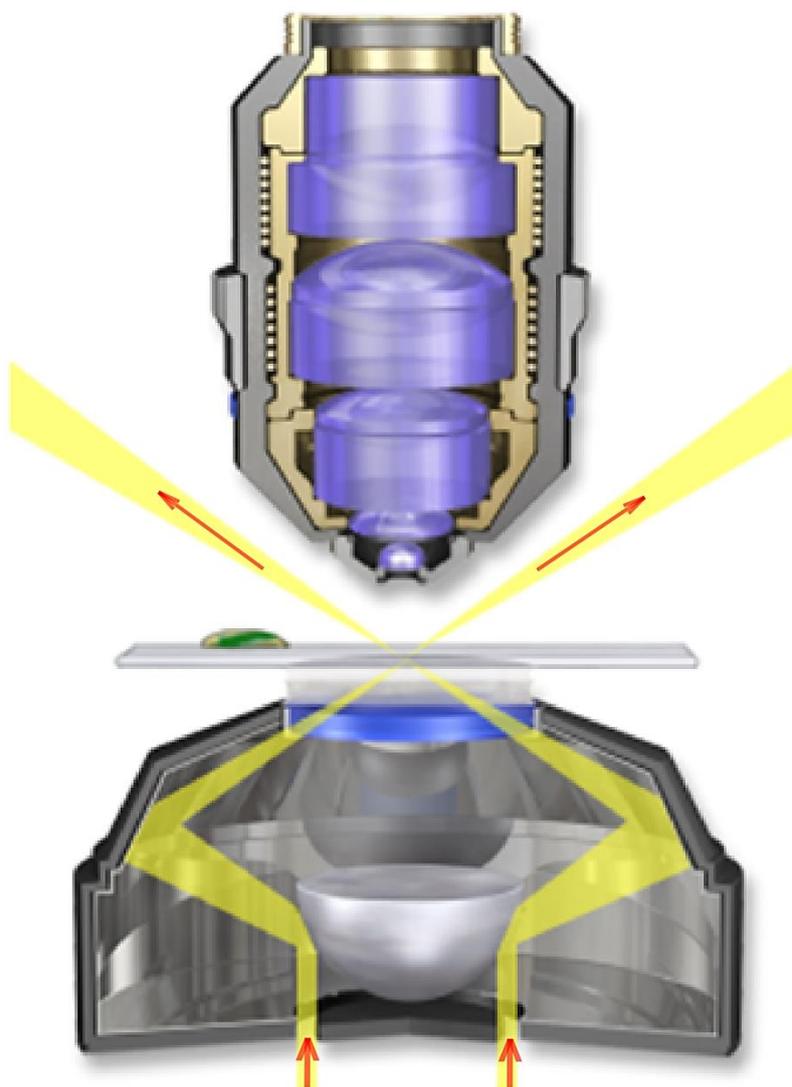


Рис. 3.3. Схема работы объектива с конденсором кардиоидного типа [3].

Во многих моделях микроскопа для темнопольного освещения применяют обычные светлосольные конденсоры со специальными вставками. Эти конденсоры используют как для светлого, так и для темного поля. На рис. 3.4. представлен конденсор с кольцевой вставкой и ход лучей в нем, а на рис. 3.5. – кольцевая диафрагма-вставка и набор слайдеров, применяемый с объективами 10, 20 и 40 крат.

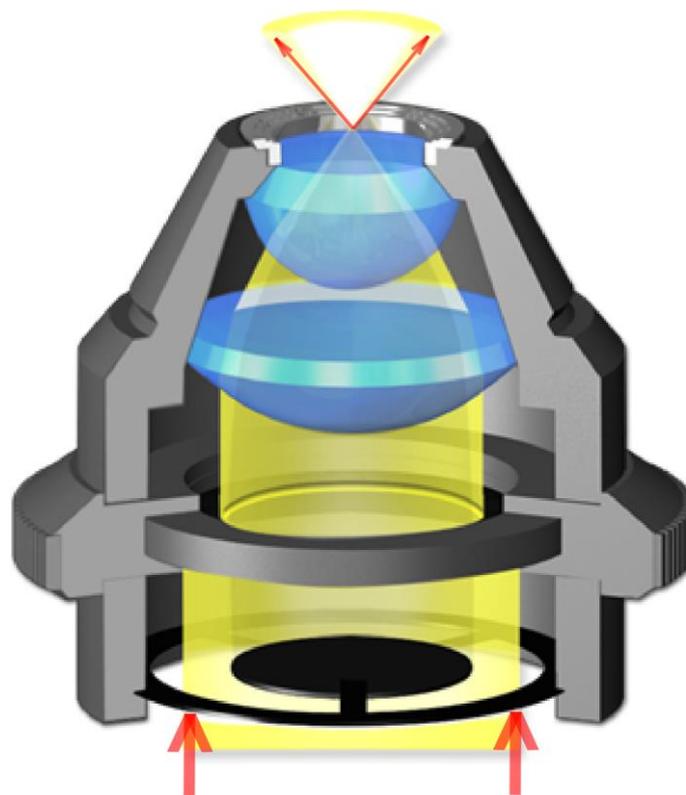


Рис. 3.4. Конденсор с кольцевой вставкой [3]. Стрелками показан ход лучей.



Рис. 3.5. Кольцевая диафрагма (слева) и специальные слайдеры с кольцевыми дисками, применяемые с объективами 10, 20 и 40 крат (микроскоп Jenamed, Zeiss).

На рис. 3.6. схематически представлены расположение объектива, конденсора с темнопольной диафрагмой, а также ход лучей в них. Диафрагму вводят в ход лучей после предварительной настройки освещения по Кёлеру. При этом необходимо соблюдать следующее условие:

$$A_k > A_{об},$$

где A_k – апертура конденсора, $A_{об}$ – апертура объектива. Это означает, что изображение центрального непрозрачного диска кольцевой диафрагмы должно перекрывать апертуру объектива.

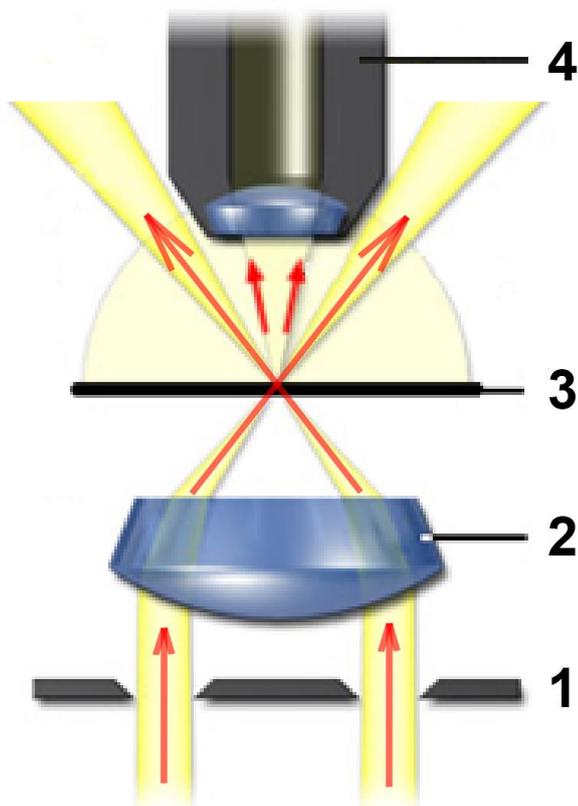


Рис. 3.6. Схема работы объектива и конденсора с кольцевой вставкой [3].
1 – кольцевая вставка, 2 – линза конденсора, 3 – плоскость предмета, 4 – объектив.

На рис. 3.7. представлены изображения волокон ваты в проходящем свете, полученные методами светлого и темного поля.

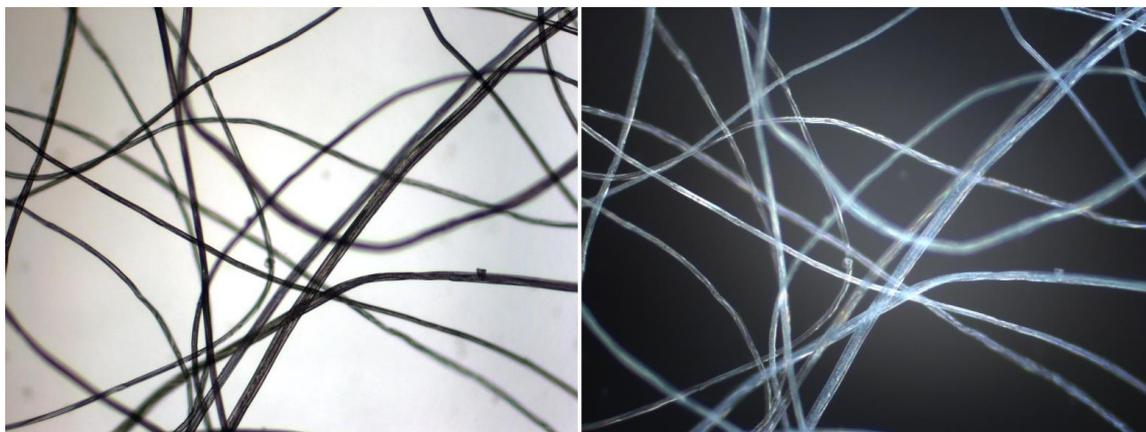


Рис. 3.7. Волокна ваты в светлом (слева) и темном (справа) поле, объектив $10\times 0,20$.

На рис. 3.8. представлены изображения неокрашенного среза ткани языка кролика. Изображения получены в проходящем свете в светлом и темном поле. В темном поле контраст изображения стал значительно лучше, хорошо видны отдельные структуры ткани.



Рис. 3.8. Изображения среза ткани языка кролика в светлом (слева) и в темном (справа) поле в проходящем свете, объектив $10\times 0,20$

3.2. Метод темного поля в отраженном свете

Метод тёмного поля в отражённом свете осуществляют с помощью осветителя отраженного света и специального зеркально-линзового объектива, называемого эпиобъективом. Применение эпиобъектива вместо обычного связано с необходимостью выполнения условия $A_k > A_{об}$. В микроскопах отраженного света обычный объектив одновременно играет роль и объектива, и конденсора, следовательно, для него $A_k = A_{об}$ (см. Глава 1, п.1.3.2.).

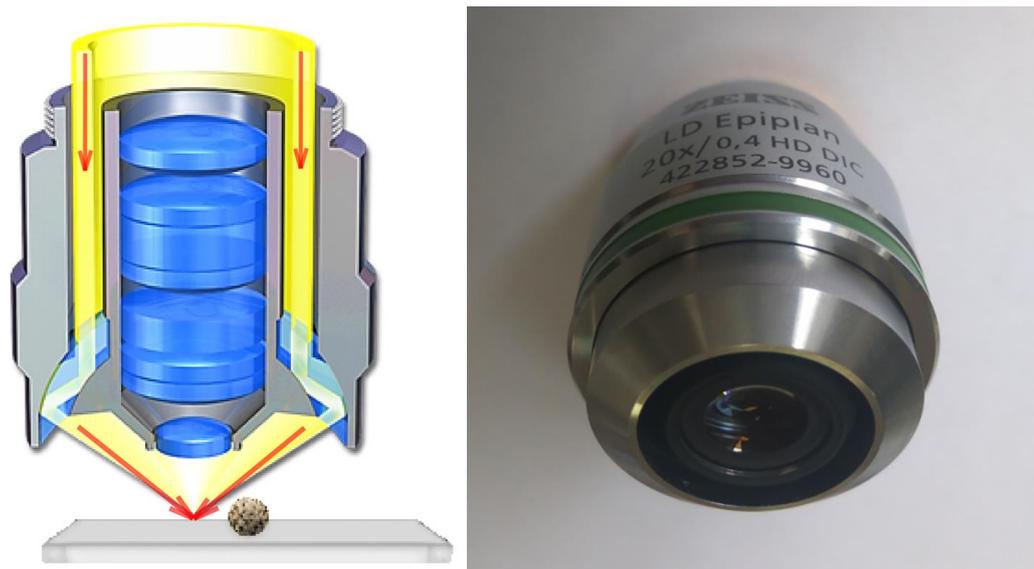


Рис. 3.9. Схематическое изображение эпиобъектива в разрезе (слева) [3] и внешний вид эпиобъектива (справа).

Конструктивно эпиобъектив состоит из двух оптических компонентов – линзового объектива и зеркального конденсора (рис. 3.9.). Линзовый объектив помещен в полый цилиндр. В цилиндре расположена зеркальная система, которая фокусирует пучки лучей в плоскость объекта. Объект освещается полым световым конусом, внутренняя апертура которого превышает апертуру линзового объектива.

На рис. 3.10. изображена одна из оптических схем темнопольного осветителя отраженного света. Коллектор 2 проецирует изображение источника света 1 в плоскость апертурной диафрагмы, в которую устанавливают кольцевую диафрагму 4. Система линз 3, 5 и наклонное кольцевое зеркало 7 переносят изображение диафрагмы 4 в плоскость апертурной диафрагмы эпиобъектива 8. Световые лучи направляются только в конденсорную часть эпиобъектива, которая проецирует полевую диафрагму 6 в плоскость объекта 9. Свет, рассеянный объектом, попадает в линзовую часть эпиобъектива 8 и направляется им в плоскость полевой диафрагмы окуляра (окуляр на рисунке не показан).

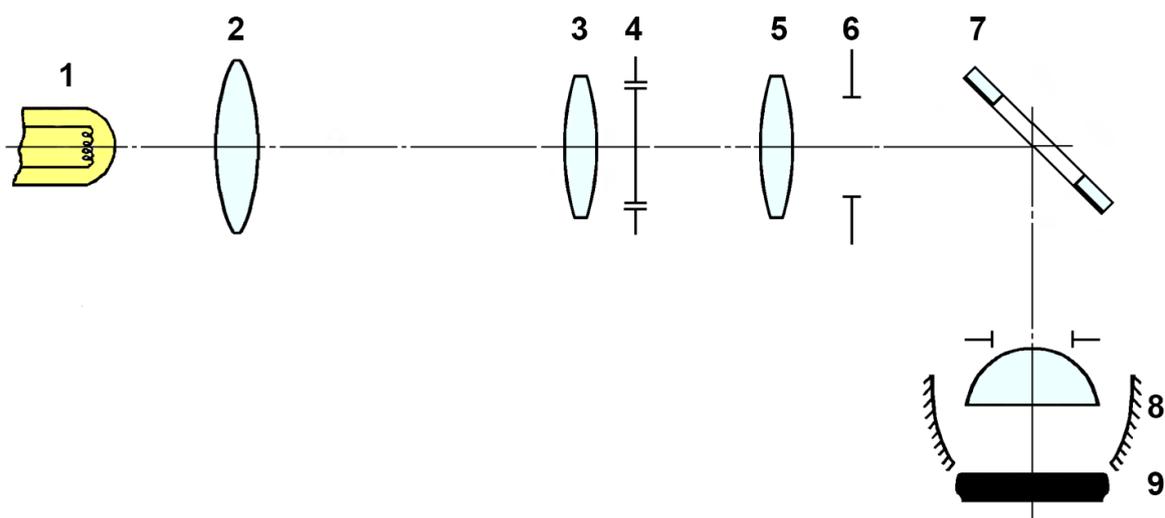


Рис. 3.10. Оптическая схема темнопольного осветителя отраженного света.

1 – источник света, 2 – коллектор, 3 и 5 – линзы; 4 – кольцевая диафрагма, 6 – полевая диафрагма, 7 – кольцевое зеркало, 8 – эпиобъектив, 9 – объект.

Таким образом, при отражении от гладкой поверхности непрозрачного объекта ни один прямой геометрический луч не попадает в линзовый объектив. В этом случае поле зрения выглядит темным.

На рис. 3.11. представлены изображения микросхемы в отраженном свете, полученные методами светлого и темного поля. В темном поле на поверхности объекта видны рассеивающие структуры (пылинки, царапины) и рельеф поверхности в виде светлых точек, а также проявились контуры отдельных компонентов микросхемы. Гладкая и чистая поверхность микросхемы выглядит черной.

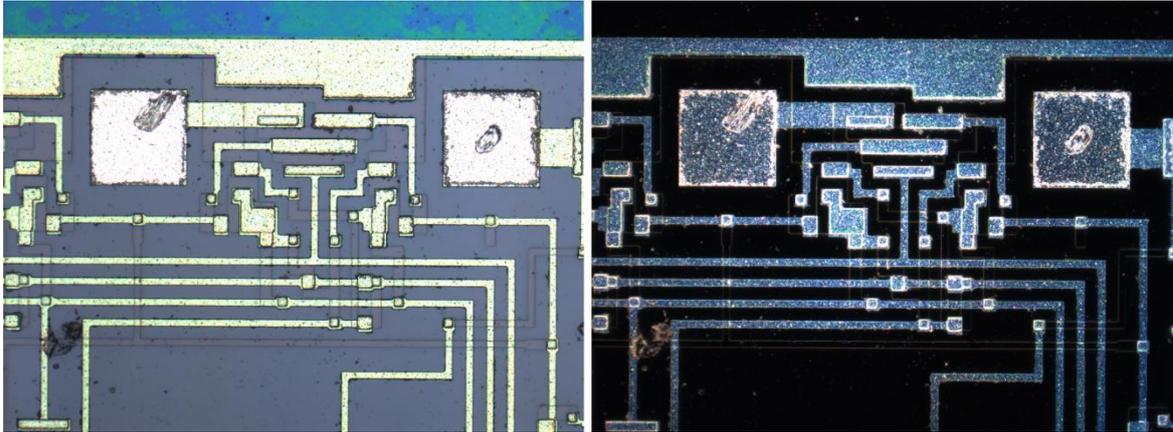


Рис. 3.11. Участок микросхемы в светлом (слева) и темном (справа) поле в отраженном свете, объектив 20×0,40.

Заключение

Темнопольное освещение представляет собой разновидность симметричного косо́го освещения. Метод требует специальных приспособлений и соблюдения определенного соотношения апертур осветительной и визуальной систем микроскопа. Как правило, металлографические микроскопы комплектуют эпиобъективами и другими принадлежностями для реализации метода темного поля.

Контрольные вопросы

1. Какое соотношение апертур конденсора и объектива необходимо установить при настройке метода темного поля?
2. Какой тип объектива специально рассчитан для метода темного поля в отраженном свете и почему?

Глава 4. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ

Метод фазового контраста предложил нидерландский ученый Фриц Цернике в 1934 году, а в 1953 году он был награжден Нобелевской премией по физике «за обоснование фазово-контрастного метода, особенно за изобретение фазово-контрастного микроскопа» [1].



Рис. 4.1. Фриц Цернике (Frits Zernike), 1888 – 1966 [4]

Для понимания принципа работы метода фазового контраста сначала необходимо вспомнить основные положения теории образования изображения в микроскопе по Аббе (Ernst Karl Abbe), изложенной в [1]. В качестве моделей объектов микроскопии Аббе предложил амплитудную и фазовую дифракционные решетки. На рис. 4.2.а изображена амплитудная дифракционная решетка с регулярной структурой в виде чередующихся темных поглощающих полос и светлых промежутков, расположенных на одинаковом расстоянии один от другого. Фазовая дифракционная решетка (рис. 4.2.б) представлена как плоскопараллельная прозрачная пластинка, на поверхности которой расположены чередующиеся бороздки на одинаковом расстоянии друг от друга.

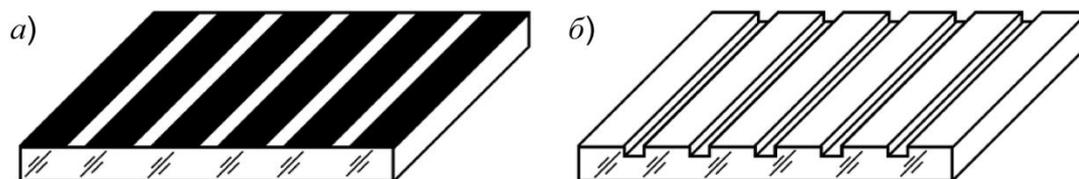


Рис. 4.2. Модели объектов микроскопии.

а) амплитудная дифракционная решетка; б) фазовая дифракционная решетка.

4.1. Сравнение первичных изображений амплитудной и фазовой решеток

На рис. 4.3. приведены две оптические схемы микроскопа проходящего света, в одной из которых объектом является амплитудная решетка 4, а во второй – фазовая решетка 7. Для освещения объекта световой волной с практически плоским волновым фронтом апертурная диафрагма конденсора 3 максимально затянута.

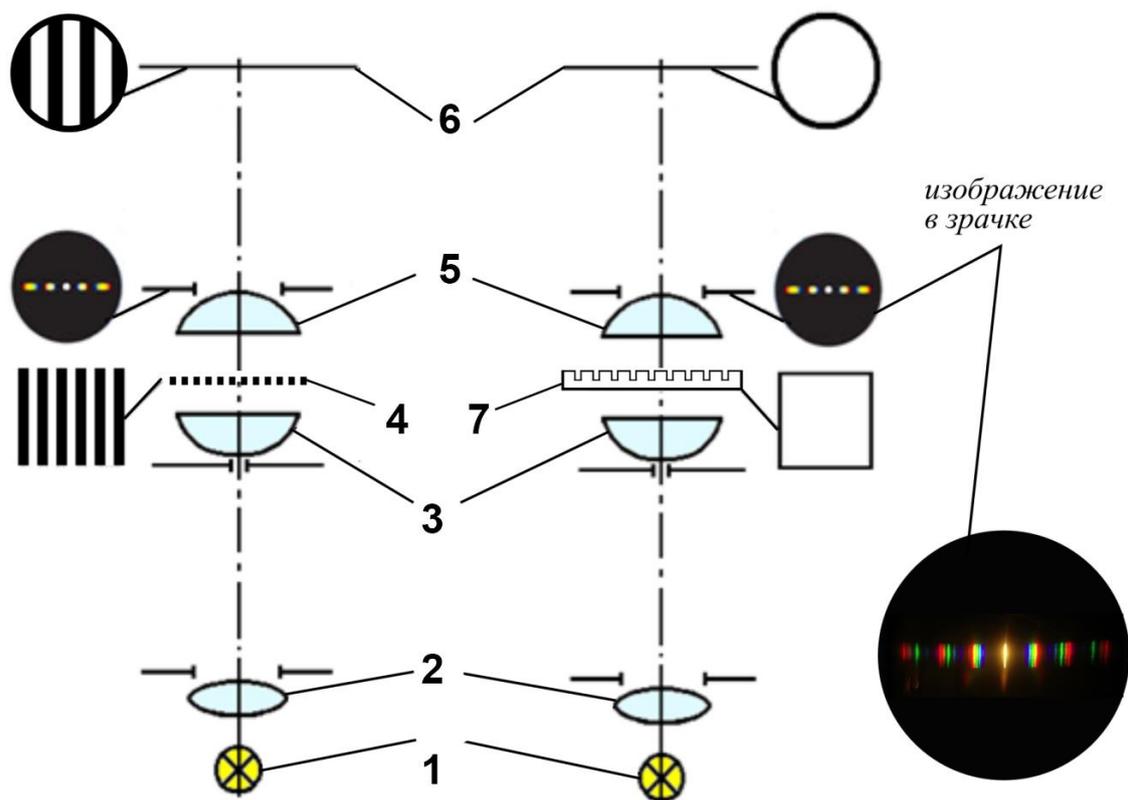


Рис. 4.3. Сравнение изображений амплитудной и фазовой дифракционных решеток. 1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – амплитудная решетка; 5 – объектив; 6 – плоскость изображения; 7 – фазовая решетка.

Согласно теории Аббе, в задней фокальной плоскости объектива 5 сначала возникает *первичное изображение*, которое является результатом дифракции света на объекте 4 (или 7). Изображение самого объекта,

названное *вторичным изображением*, формируется в результате соединения и взаимодействия (интерференции) световых волн, идущих от первичного изображения. Чем больше апертурный угол объектива 5, тем больше дифрагированных пучков от объекта попадает в *первичное изображение* и тем точнее воспроизводится *вторичное изображение* в плоскости 6 [2].

Одно из основных положений теории заключается в том, что при попадании в объектив всех дифрагированных лучей изображение в плоскости 6 получается в точности подобным объекту 4 (или 7) как по амплитуде, так и по фазе. Именно подобие по фазе световых колебаний в объекте и изображении является особенно важным в методе фазового контраста. Проходя через прозрачный и бесцветный объект, свет претерпевает изменения только по фазе (см. рис. 2.1.). Превратить эти изменения фаз в объекте в изменения освещенности в изображении – задача метода фазового контраста. Сравнивая спектры амплитудной и фазовой решеток в зрачке объектива 5, можно заметить, что они очень похожи. Возникает вопрос: в чем причина такой разницы изображений в плоскости 6 при очень похожих спектрах в зрачке 5?

На рисунках 4.4. и 4.5. представлены спектры амплитудной и фазовой решеток при освещении монохроматическим светом, а на рис. 4.6. – спектр амплитудной решетки при немонахроматическом освещении.

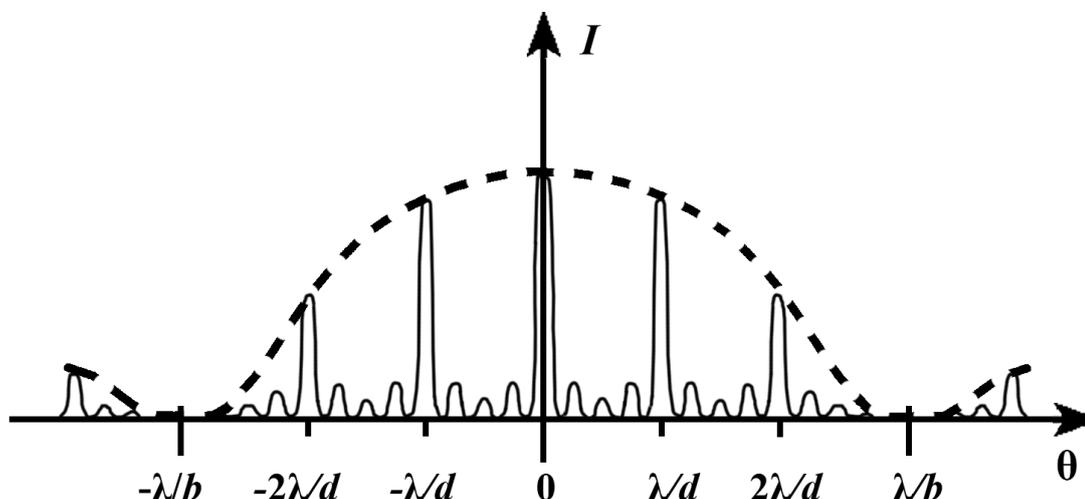


Рис. 4.4. Спектр амплитудной решетки в монохроматическом свете при $N = 4$. N – количество щелей, I – интенсивность, d – период решетки, b – ширина щелей, θ – угол дифракции, λ – длина волны [12].

Чем отличаются спектры амплитудной и фазовой решеток? На первый взгляд они отличаются только интенсивностью нулевых порядков. Однако Цернике считал, что спектры отличаются не только интенсивностями, но и фазами нулевых порядков. Это следует из

принципа Гюйгенса-Френеля: при любых условиях дифракции прошедшая волна отстает по фазе от исходной волны на $\pi/2$ [6].

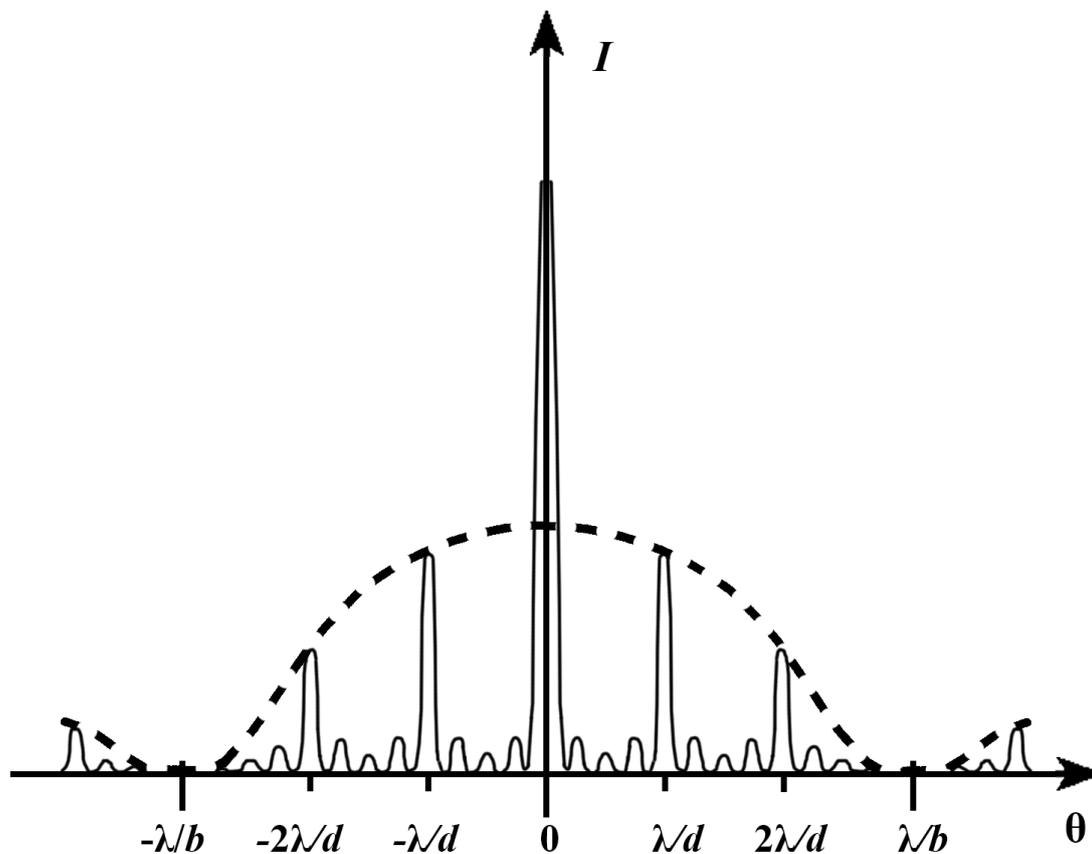


Рис. 4.5. Спектр фазовой решетки в монохроматическом свете при $N = 4$. N – количество щелей, I – интенсивность, d – период решетки, b – ширина щелей, θ – угол дифракции, λ – длина волны.

Сравним ход лучей через амплитудную и фазовую решетки, представленных на рисунке 4.2. Для качественного рассмотрения прохождения лучей через амплитудную и фазовую решетки воспользуемся другой теорией дифракции, а именно *геометрической теорией дифракции*. Эта теория позволяет представить сложные конфигурации светового поля в виде суперпозиции стандартных полей (см. Приложение 1). Если глубина бороздок фазовой решетки мала, то разность фаз между дифрагированными и геометрическими лучами составит $\pi/2$. В нулевой порядок амплитудной решетки попадают дифрагированные лучи, совпадающие по направлению с геометрическими. В нулевой порядок фазовой решетки попадают и прямые дифрагированные лучи, и геометрические лучи (рис. 4.7.). При этом интенсивность нулевого порядка в спектре фазовой решетки определяют именно геометрические лучи. Отсюда и появляется отличие фазы нулевого порядка на $\pi/2$ от всех остальных порядков в спектре фазовой решетки.

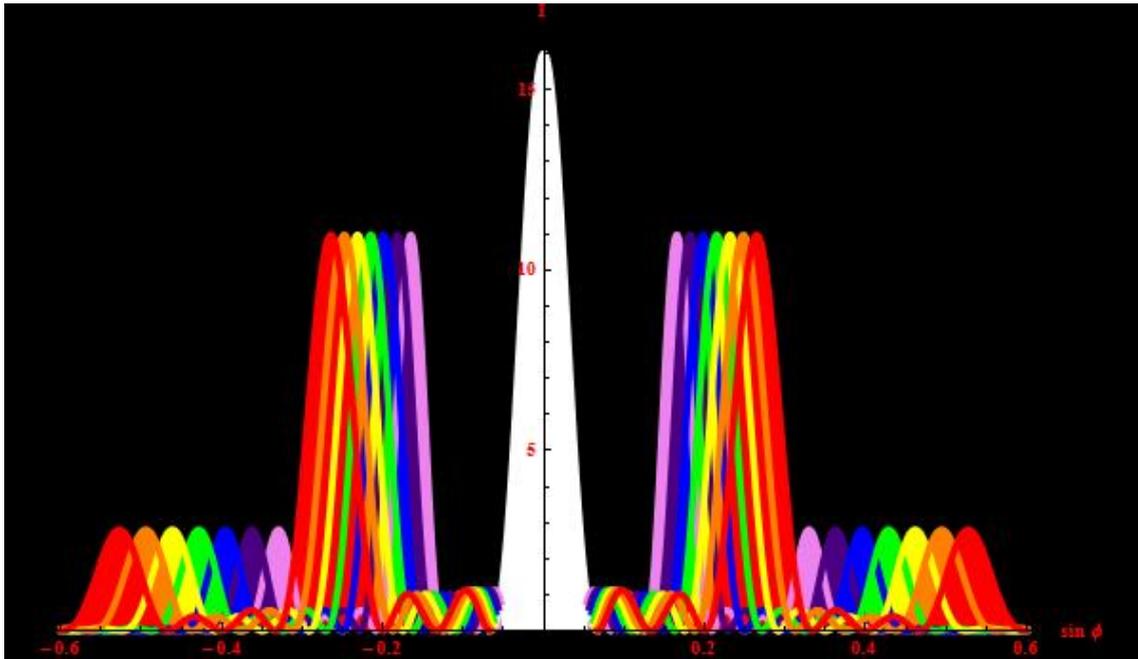


Рис. 4.6. Спектр амплитудной решетки при освещении немонохроматическим светом $N = 4$, где N – количество щелей [11].

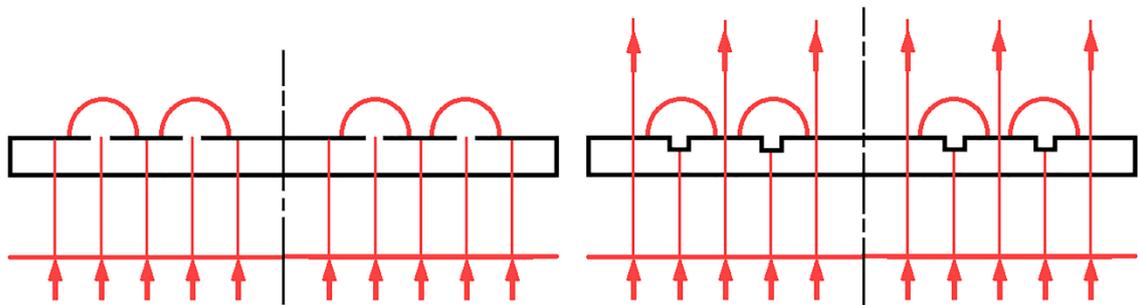


Рис. 4.7. Ход лучей через амплитудную (слева) и фазовую (справа) решетки.

А как выглядит изображение нулевого порядка в выходном зрачке объектива? При затянутой ирисовой диафрагме конденсора 3 (рис. 4.3.) и отсутствии объекта изображение нулевого порядка представляет собой круг в центре выходного зрачка объектива (рис. 4.8.а.). Минимально возможный размер этого круга равен диаметру диска Эйри. При наличии объекта-решетки в зрачке формируется *первичное изображение* в виде спектра (на рис. 4.8.б. изображены только нулевой и первые порядки). Из рисунка (б) видно, что порядки перекрываются. Если в конденсор поместить кольцевую диафрагму, как при косом симметричном освещении, то тогда без объекта изображение нулевого порядка будет выглядеть в виде кольца (рис. 4.8.в.), а при наличии объекта-решетки – в виде пересекающихся колец (рис. 4.8.г.). Следует заметить, что в случае (г) площадь перекрытия порядков стала значительно меньше, чем в (б).

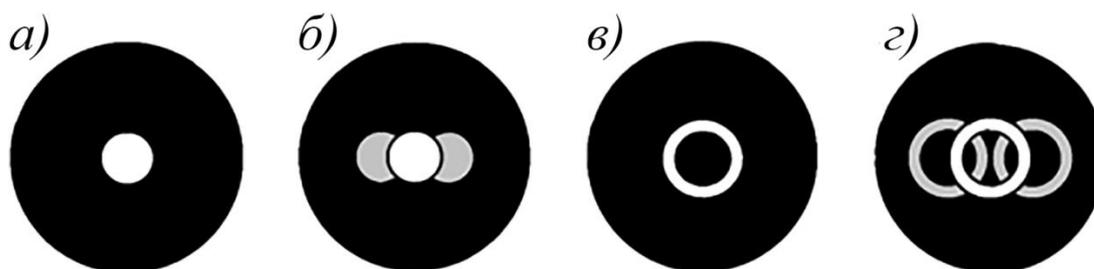


Рис. 4.8. Изображения диафрагм конденсора (*a* и *в*) и первичных изображений объекта-решетки (*б* и *г*) в выходном зрачке объектива.

Что будет, если каким-либо способом изменить фазу нулевого порядка фазовой решетки, уравнив ее с фазой нулевого порядка амплитудной решетки? Станет ли при этом изображение фазовой решетки таким же, как амплитудной? Если теория Аббе верна, то при одинаковых *первичных изображениях* следует ожидать одинаковые *вторичные изображения*. Эту задачу Цернике предложил осуществить путем искусственного приема, который позволяет привести *первичное изображение* прозрачного объекта к виду *первичного изображения* поглощающего объекта.

4.2. Принцип работы метода фазового контраста

Цернике предложил изменить фазу нулевого порядка и указал, как это сделать практически. В результате изображение непрозрачного объекта получают благодаря изменению фазы центрального максимума и снижению его интенсивности. На рис. 4.9. представлена принципиальная схема фазово-контрастного устройства.

После настройки освещения по Кёлеру в ход лучей конденсора вводят кольцевую диафрагму 6. Геометрическое изображение этой диафрагмы в выходном зрачке 5 объектива представляет собой нулевой порядок в виде кольца. Затем в плоскость 5, то есть в плоскость формирования *первичного изображения*, помещают пластинку с фазовым кольцом 7. Фазовое кольцо покрывает изображение кольцевой диафрагмы и одновременно изменяет фазу и уменьшает интенсивность нулевого порядка. Весь свет, прошедший через препарат 3 без отклонений, обязательно пройдет через фазовое кольцо и претерпит указанные изменения. Остальной дифрагированный свет проходит мимо фазового кольца и не получает никаких изменений. Световые волны, прошедшие как сквозь фазовое кольцо, так и мимо фазового кольца, соединяются в плоскости *вторичного изображения*, где и дают контрастное изображение структуры прозрачного объекта.

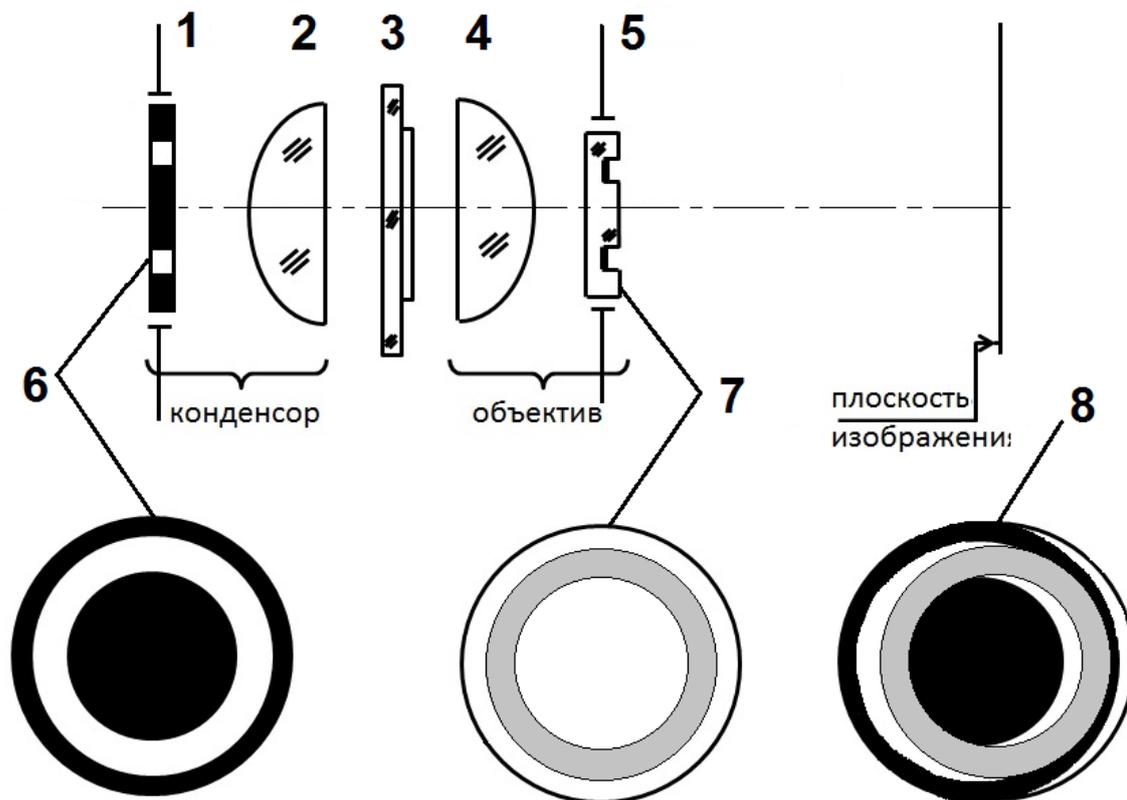


Рис. 4.9. Принципиальная схема фазово-контрастного устройства.

1 – апертурная диафрагма конденсора; 2 – линза конденсора; 3 – препарат; 4 – линза объектива; 5 – апертурная диафрагма объектива (выходной зрачок); 6 – кольцевая вставка; 7 – пластинка с фазовым кольцом; 8 – смещенные друг относительно друга фазовое кольцо и изображение кольцевой диафрагмы, которые необходимо совместить для получения изображения объекта.

Выбор формы осветительной диафрагмы в виде кольца обусловлен минимальным перекрытием порядков дифракции (см. рис. 4.8.2.), что позволяет уменьшить нарушение подобия. В фазовом объективе в плоскости, расположенной вблизи выходного зрачка, на стеклянной поверхности вытравливают кольцевую канавку на расчетную глубину и покрывают ее поглощающим слоем, например, алюминия. Поглощение слоя составляет примерно 70%.

В фазово-контрастном методе можно получить как позитивный, так и негативный контраст. При позитивном фазовом контрасте структуры объекта с большим показателем преломления выглядят в плоскости изображения более темными. В этом случае фазовое кольцо представляет собой канавку, которая вносит разность фаз $\pi/2$. При негативном фазовом контрасте фазовое кольцо делают выпуклым. Это кольцо вносит в нулевой порядок «запаздывание» на $3/2\pi$. В этом случае структуры с большим показателем преломления выглядят светлыми относительно окружающего фона.

4.3. Конструктивные особенности и примеры изображений

На рис. 4.10. представлено фазово-контрастное устройство КФ-5. В состав устройства входят: комплект фазовых объективов 1, конденсор 2 с держателем кольцевых диафрагм различного диаметра, светофильтр 3 и вспомогательный микроскоп 4. Фазовый конденсор устанавливают на микроскоп вместо обычного конденсора. Вспомогательный микроскоп МИР-4 помещают вместо окуляра, что позволяет наблюдать выходной зрачок объектива с целью совмещения изображения кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива. Совмещение колец осуществляется с помощью юстировочных винтов конденсора. После совмещения колец вспомогательный микроскоп удаляют и устанавливают окуляр.



Рис. 4.10. Общий вид фазово-контрастного устройства КФ-5 ф. ЛОМО.

1 – комплект фазовых объективов: $20 \times 0,40$; $40 \times 0,65$; $70 \times 1,23$, $90 \times 1,25$;
2 – конденсор; 3 – светофильтр; 4 – вспомогательный микроскоп МИР-4 [13].

На рис. 4.11. представлены два изображения неокрашенных клеток эпителия в светлом поле (слева) и в фазовом контрасте (справа). Фазовый контраст позволяет видеть те элементы структуры клеток, которые весьма мало отличаются от среды по показателю преломления или толщине.

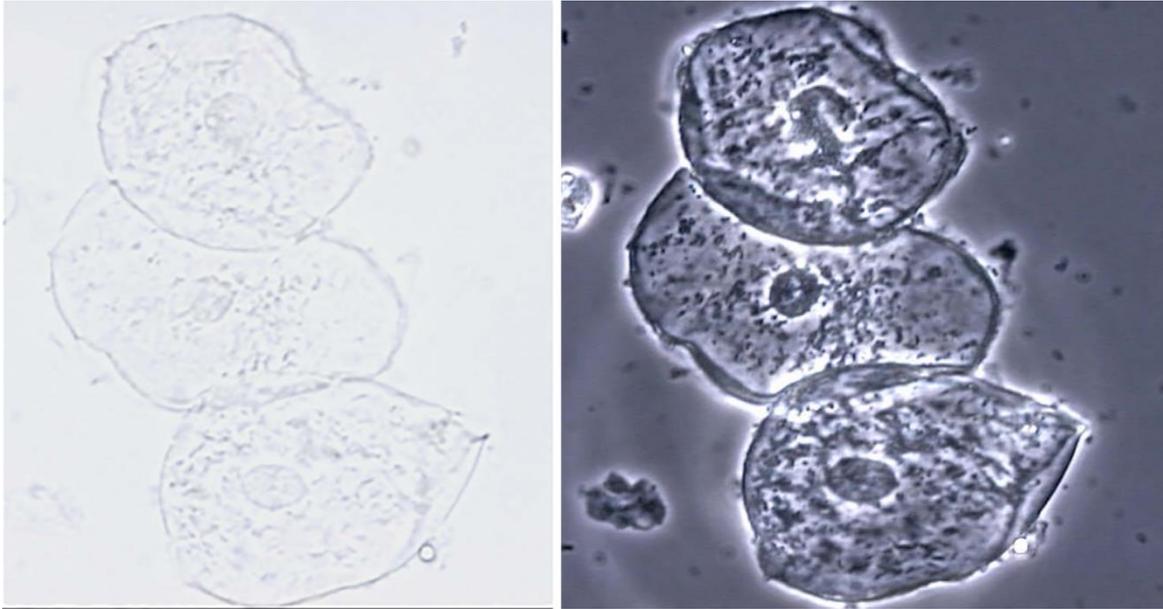


Рис. 4.11. Изображение клеток эпителия в светлом поле (слева) и фазовом контрасте (справа).

4.4. Оптический артефакт фазового контраста

Метод фазового контраста позволяет получать изображения неокрашенных малоcontrastных объектов, но контраст зависит от размера и характера изменения оптической толщины объекта. Метод дает хорошие результаты для тех объектов, которые имеют участки с резкими (ступенчатыми) изменениями оптической толщины. Это связано с тем, что на «ступеньках» дифракция происходит с большей амплитудой и поэтому получают контраст выше, чем при плавных изменениях. Кроме того, метод не дает хороших результатов для следующих типов объектов:

1. тесно уложенные или примыкающие структуры;
2. объекты со сравнительно большими поперечными размерами;
3. объекты с плавными изменениями показателя преломления.

Фазовый контраст всегда сопровождается оптическим артефактом, известным под названием «ореол» или «гало». Этот артефакт является результатом дифракции света на самом фазовом кольце. Ореол проявляется как яркая светлая полоса вокруг темного изображения детали объекта при позитивном фазовом контрасте или как темная полоса – при негативном фазовом контрасте. На рис. 2.12 видны ореолы в виде яркого канта вокруг более темного изображения нейрона и инфузории туфелька.

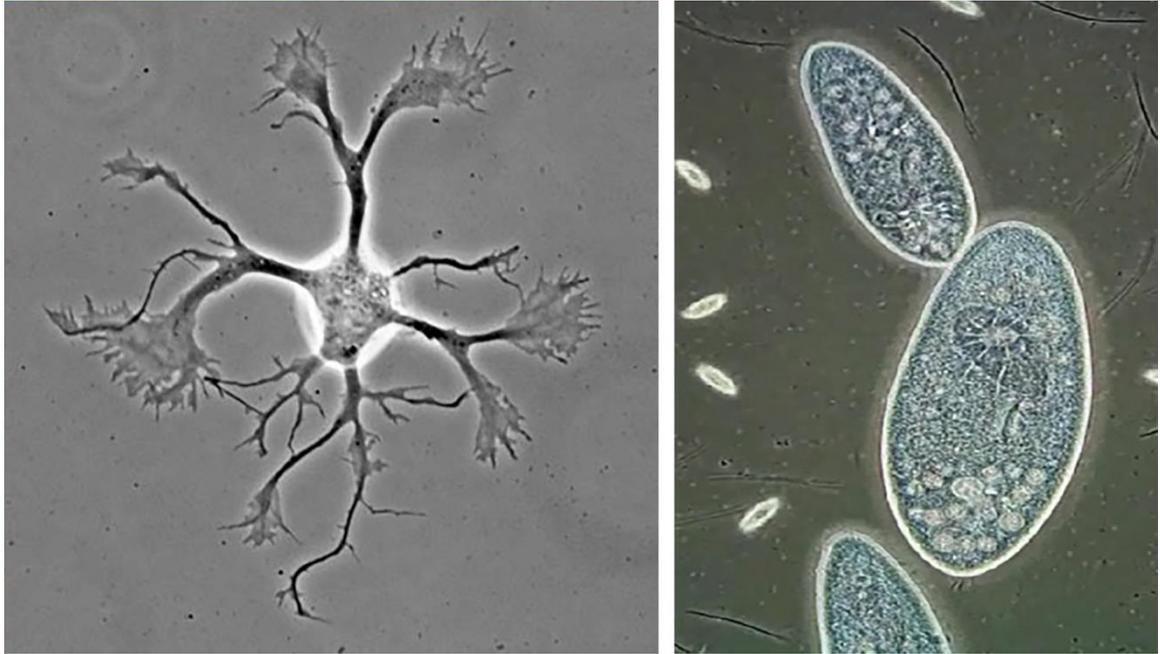


Рис. 4.12. Незрелый нейрон культуры ткани (слева) и инфузория тувелька (справа).

Заключение

Метод фазового контраста позволяет получать изображения неокрашенных объектов, но обладает не только преимуществами, но и недостатками, например, наличием канта. Кроме того, фазово-контрастное устройство содержит специальные объективы с фазовым кольцом, что затрудняет переход к другим методам исследования.

Контрольные вопросы

1. На какое отличие между спектрами амплитудной и фазовой решетки обратил внимание Цернике?
2. Что представляет собой изображение в задней фокальной плоскости объектива?
3. Принцип работы устройства фазового контраста?
4. Чем отличаются методы позитивного и негативного фазового контраста?
5. Какими артефактами обладает метод фазового контраста и чем они обусловлены?

Глава 5. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ КОНТРАСТ

Изображение фазовых или слабоконтрастных объектов позволяет получать интерференционная микроскопия [14]. На рис. 5.1. представлены две принципиальные схемы интерференционного микроскопа: схема (а) предназначена для измерения оптической разности хода; схема (б) – для получения контрастного изображения. Препарат 2–4 помещают в двухлучевой интерферометр, один из элементов которого делит луч света в точке F на два когерентных луча. Второй элемент интерферометра объединяет оба луча в точке F' , образуя общий луч.

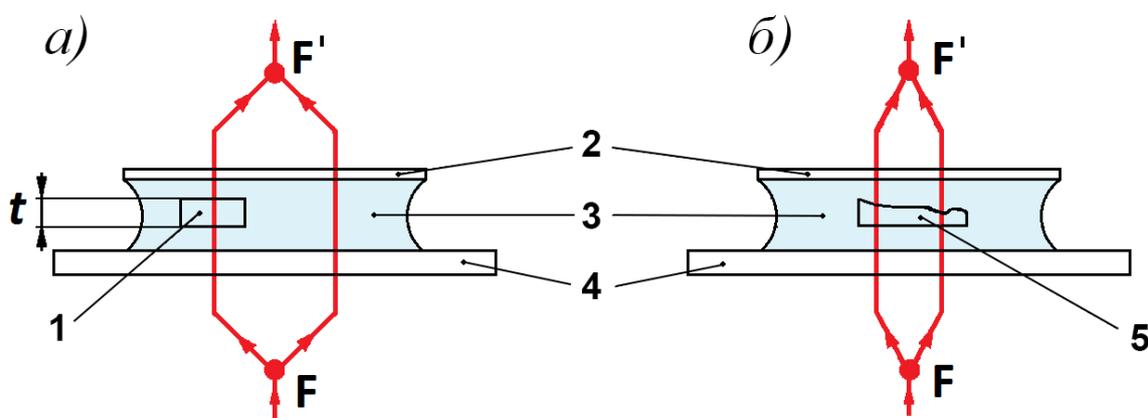


Рис. 5.1. Принципиальные схемы интерференционного микроскопа.

а) схема для измерения оптической разности хода;

б) схема визуализации фазового объекта.

1 – фазовый объект (t – толщина объекта); 2 – покровное стекло; 3 – среда; 4 – предметное стекло; 5 – фазовый объект произвольной формы.

В схеме (а) первый луч проходит через объект 1 (показатель преломления $n_{об}$ и толщина t), а второй – через среду 3 (показатель преломления среды $n_{ср}$). Интерференционная схема настраивается таким образом, чтобы в отсутствие объекта 1 разность хода двух лучей была равна нулю. Это означает, что оба луча проходят через препарат в одинаковых условиях. При введении объекта 1 в одну из ветвей интерферометра лучи приобретают разность хода δ , равную $\delta = (n_{об} - n_{ср})t$. Такой интерференционный микроскоп позволяет измерить эту разность хода (см. главу 7).

На рис. 5.1.б. представлена интерференционная схема, в которой оба луча проходят через фазовый объект 5. Этот объект является, в общем случае, неоднородным либо по толщине, либо по показателю преломления, либо по тому и другому одновременно. Каждый луч, точнее пучок лучей, создает изображение (плоскость изображения на рисунке не показана). Микроскопист не должен видеть двоения изображения; кроме

того, получение приемлемого контраста требует создания таких условий, при которых разность фаз между лучами при интерференции приводила бы к заметному изменению освещенности или изменению цвета. Однако у реальных объектов, как правило, фазовые изменения очень малы. Исправить этот недостаток возможно за счет введения разности фаз между лучами еще до их входа в объект.

Устройство дифференциально-интерференционного контраста (сокращенно ДИК или DIC) работает по схеме (б) и представляет собой частный случай интерференционного микроскопа, а получаемый контраст определяется фазовыми изменениями света, прошедшего через объект.

5.1. Краткая историческая справка

Различные схемы интерференционных микроскопов отличаются друг от друга способом получения волны сравнения. А.А. Лебедев предложил оригинальный поляризационный интерферометр. В 1931 году под его руководством впервые в мире был разработан интерференционный двухлучевой микроскоп проходящего света [15]. Его особенность состоит в том, что разделение и воссоединение интерферирующих пучков осуществляется двулучепреломляющими кристаллическими элементами. Это позволяет направить оба интерферирующих луча через одни и те же оптические компоненты системы, что делает интерференционную картину *высокостабильной*.



У.Х. Волластон (W.H. Wollaston),
1766-1828



А.Э. де Сенармон (H.H. de Sénarmont),
1808 - 1862

Рис. 5.2. Портреты ученых-изобретателей призмы Волластона и компенсатора Сенармона [3].

Лебедев предложил в интерференционном микроскопе в точках F и F' (рис. 5.1.) установить двулучепреломляющие кристаллические пластинки в качестве элементов интерферометра. В 1947 году Френсис

Смит предложил вместо кристаллических пластинок использовать призмы Волластона [16, 17].

Впоследствии в методе ДИК стали применять еще одно поляризационное устройство, предложенное А.Э. Сенармоном (рис. 5.2.) и называемое компенсатором Сенармона.

5.2. Поляризованный свет и поляризационные компоненты ДИК

Перед тем, как перейти к описанию устройства ДИК, напомним некоторые положения, связанные с поляризованным светом, а также с принципом действия используемых поляризационных деталей и устройств.

Поляризованным светом, в отличие от *естественного*, называют такой свет, который обладает определенными фазовыми соотношениями между взаимно-перпендикулярными компонентами вектора напряженности электрического поля E (или магнитного H), причем эти компоненты когерентны.

Для монохроматического света наиболее общим случаем поляризации является *эллиптическая* поляризация, а ее частными случаями – *линейная* и *круговая*. При эллиптической поляризации света концы векторов E и H данной фазы в бегущей электромагнитной волне описывают пространственные эллиптические спирали.

5.2.1. Эллиптически поляризованный свет

Эллиптически поляризованную световую волну представляют как сумму двух когерентных линейно-поляризованных световых волн, электрические векторы E которых совершают колебания в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. Колебания электрических полей E_1 и E_2 этих волн в точке пространства имеют вид:

$$E_1 = E_1^0 \sin(\omega t) \quad \text{и} \quad E_2 = E_2^0 \sin(\omega t + \delta),$$

где E_1^0 и E_2^0 – амплитуды, ω – циклическая частота, δ – постоянная разность фаз.

На рис. 5.3. показана ориентация векторов E_1 и E_2 в пространстве и ориентация эллипса, описываемого концом вектора результирующего электрического поля E , равного в каждый момент времени векторной сумме E_1 и E_2 . Уравнение эллиптичности в координатах E_1 и E_2 имеет вид:

$$\left(\frac{E_1}{E_1^0}\right)^2 + \left(\frac{E_2}{E_2^0}\right)^2 - \frac{E_1 E_2}{E_1^0 E_2^0} \cos \delta = \sin^2 \delta.$$

Эллипс вписан в прямоугольник со сторонами $2E_1^0$ и $2E_2^0$. Если разность фаз $\delta = 0$ или $\delta = k\pi$, где k – целое число, то эллипс превращается в прямую, и эллиптическая поляризация переходит в *линейную поляризацию*. Если $\delta = k\pi/2$, где k – нечетное целое число, и $E_1^0 = E_2^0$, то

эллипс становится кругом (*круговая поляризация света*). Ориентация эллипса относительно E_1 и E_2 зависит от δ . Эллиптически-поляризованный свет формируется при прохождении линейно-поляризованного света через кристаллические пластинки [18].

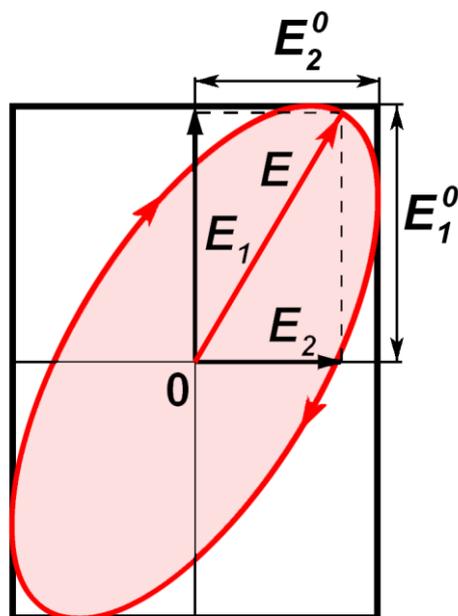


Рис. 5.3. Схема ориентации эллипса, описываемого концом вектора результирующего электрического поля E [18].

Ортогональные формы поляризованного света. На рис. 5.4. представлены три пары ортогональных форм поляризации. Два линейно-поляризованных луча называются ортогональными, если они распространяются в одном направлении, а их азимуты отличаются на 90° (рис. 5.4.а). Два луча круговой поляризации называются ортогональными, если они распространяются в одном направлении и являются право- и левовращающими (5.4.б). Два эллиптически поляризованных луча называются ортогональными, если азимуты главных осей отличаются на 90° , эллипсы имеют одинаковую форму, а направления их вращения противоположны.

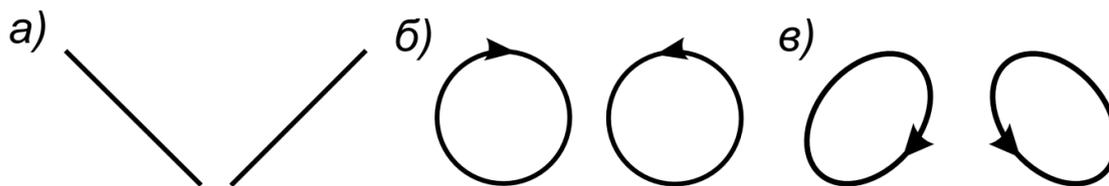


Рис. 5.4. Проекция на плоскость ортогональных пар лучей [22].
а) линейные; б) круговые; в) эллиптические.

Любую форму поляризации можно превратить в любую другую

форму, например, с помощью соответствующей фазовой пластинки. В принципе это превращение имеет практически 100%-й коэффициент полезного действия и не сопровождается потерей интенсивности [22].

5.2.2. Эффект двойного лучепреломления и призма Волластона

Двойное лучепреломление или *двулучепреломление* – эффект расщепления луча света в анизотропной среде (например, в кристалле) на две взаимно ортогональные составляющие, распространяющиеся внутри среды с разными скоростями. Если луч света падает перпендикулярно к поверхности кристалла, то на этой поверхности он расщепляется на два луча [4]. *Оптическая ось* двулучепреломляющего вещества – выделенное направление в веществе, например, в кристалле. Различают два вида двулучепреломляющих объектов – одноосные и двуосные. В одноосных объектах (кристаллах) существует одно направление, вдоль которого оба луча (обыкновенный и необыкновенный) распространяются с одинаковыми скоростями; в двуосных – два таких направления. Плоскость, проходящую через падающий луч и оптическую ось, называют *главным сечением* [18].

Призма Волластона – двулучепреломляющая поляризационная призма, предназначенная для разделения луча на два линейно поляризованных луча, расходящихся под некоторым углом друг к другу. Призма Волластона состоит из двух геометрически одинаковых склеенных клиньев из двоякопреломляющего кристалла.

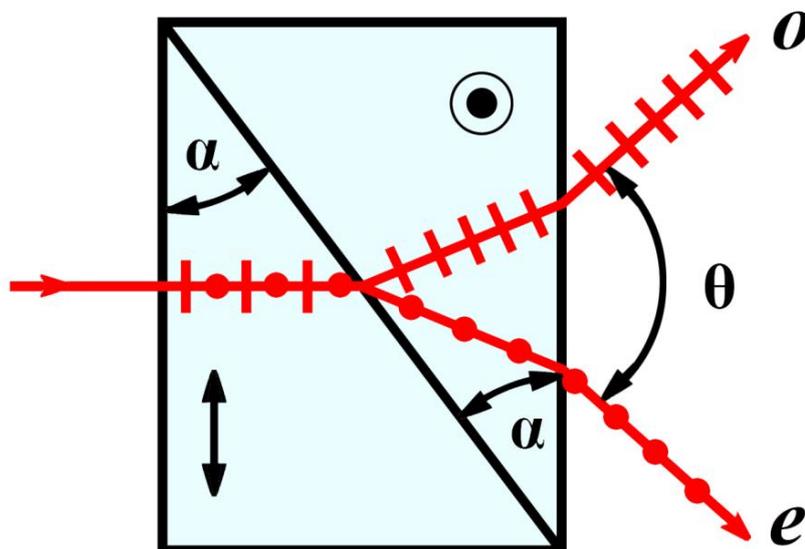


Рис. 5.5. Призма Волластона [18].

o – обыкновенный луч; *e* – необыкновенный луч; α – преломляющий угол клина; θ – угол между обыкновенным и необыкновенным лучами.

В первом клине оптическая ось кристалла лежит в плоскости

рисунка параллельно входной грани (рис. 5.5.), а во втором клине – перпендикулярна плоскости рисунка. Луч света, падающий нормально на грань первого клина, разделяется на два линейно-поляризованных луча – *обыкновенный* и *необыкновенный*. В первом клине они распространяются с различными скоростями, но по одному направлению. При входе во второй клин обыкновенный луч становится необыкновенным, а необыкновенный – обыкновенным. На границе раздела (в области склейки) лучи претерпевают преломление, отклоняясь на различные углы. После дополнительного преломления на выходной грани второго клина эти лучи почти симметрично отклоняются в разные стороны от первоначального направления и составляют между собой угол $\theta = 2(n_o - n_e)tg\alpha$, где n_o и n_e – показатели преломления обыкновенного и необыкновенного лучей, α – преломляющий угол клина [18].

5.2.3. Фазовые пластинки и компенсатор Сенармона

Фазовая пластинка представляет собой оптический элемент, предназначенный для изменения формы поляризации. Фазовая пластинка расщепляет поляризованный пучок лучей на две компоненты и изменяет фазу одной из них.

Пластинка $\lambda/2$ (полуволновая фазовая пластинка) – пластинка из прозрачного, оптически анизотропного вещества, при прохождении через которую две составляющие светового пучка с направлениями колебаний вдоль двух определенных взаимно-перпендикулярных направлений в плоскости пластинки (*главные направления*) приобретают разность хода, равную половине длины волны ($\lambda/2$) или $(m + \lambda/2)$, где m - целое число. При прохождении через пластинку $\lambda/2$ линейно-поляризованного света с направлением колебаний, составляющим угол α с одним из главных направлений, свет остается линейно-поляризованным, но направление колебаний поворачивается на угол 2α .

Пластинка $\lambda/4$ (четвертьволновая фазовая пластинка) – пластинка из прозрачного, оптически анизотропного вещества, при прохождении через которую две составляющие светового пучка с направлениями колебаний вдоль *главного направления* приобретают разность хода, равную $\lambda/4$ (или разность фаз $\pi/2$).

Компенсатор Сенармона – оптическое устройство, состоящее из вращающегося поляризатора и фазовой пластинки $\lambda/4$. Устройство применяют для изменения формы поляризации, например, превращение линейно-поляризованного света в эллиптически поляризованный (рис. 5.6.).

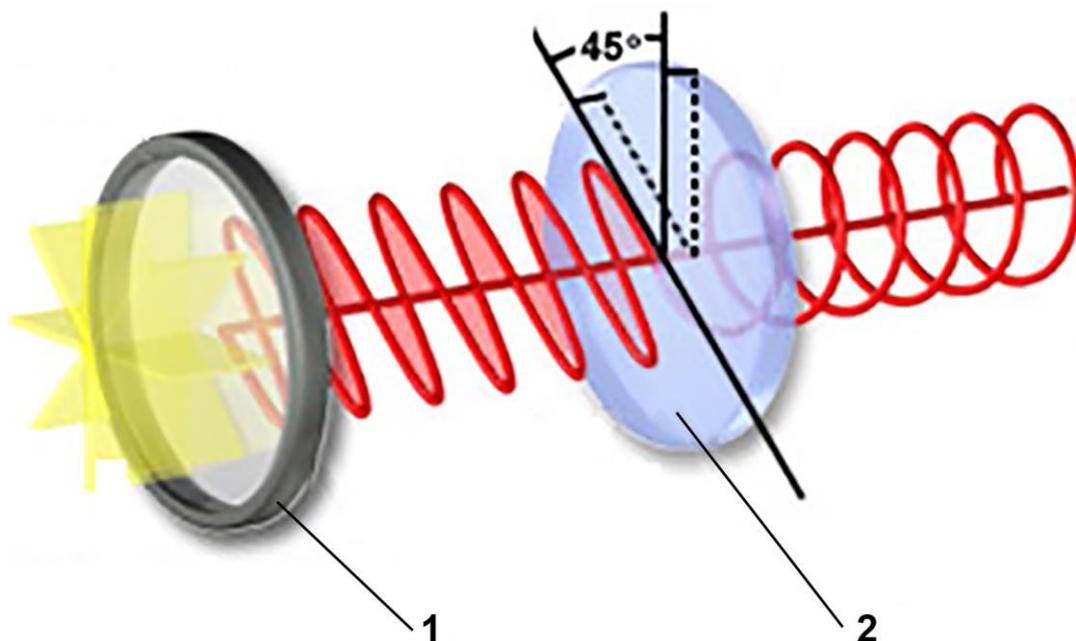


Рис. 5.6. Компенсатор Сенармона [3].
1 – поляризатор; 2 – фазовая пластинка $\lambda/4$.

Поворот поляризатора на $\pm 45^\circ$ приводит к изменению разности хода на $\Delta = \pm \lambda/4$.

5.3. Принцип дифференциально-интерференционного контраста

Дифференциально-интерференционный контраст (ДИК) предназначен для визуализации фазовых *изотропных* объектов. Устройство преобразует градиенты оптического пути образца в изменения амплитуды. Иными словами, ДИК позволяет визуализировать те элементы структуры, которые весьма мало отличаются от среды по показателю преломления, толщине или коэффициенту отражения, создавая контрастное псевдо-рельефное изображение. Устройство ДИК напоминает традиционный поляризационный микроскоп, дополнительно оснащенный двоякопреломляющими призмами для разделения лучей.

Данный метод осуществляют несколькими способами. Рассмотрим один из них. На рис. 5.7. представлена оптическая схема ДИК в проходящем свете. Освещение в микроскопе строго настраивают по Кёлеру: линза осветителя 1 проецирует изображение источника в плоскость апертурной диафрагмы конденсора 2; линза конденсора проецирует полевую диафрагму осветителя в плоскость объекта 3; объектив 4 создает изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы 10, наблюдаемое через окуляр 5.

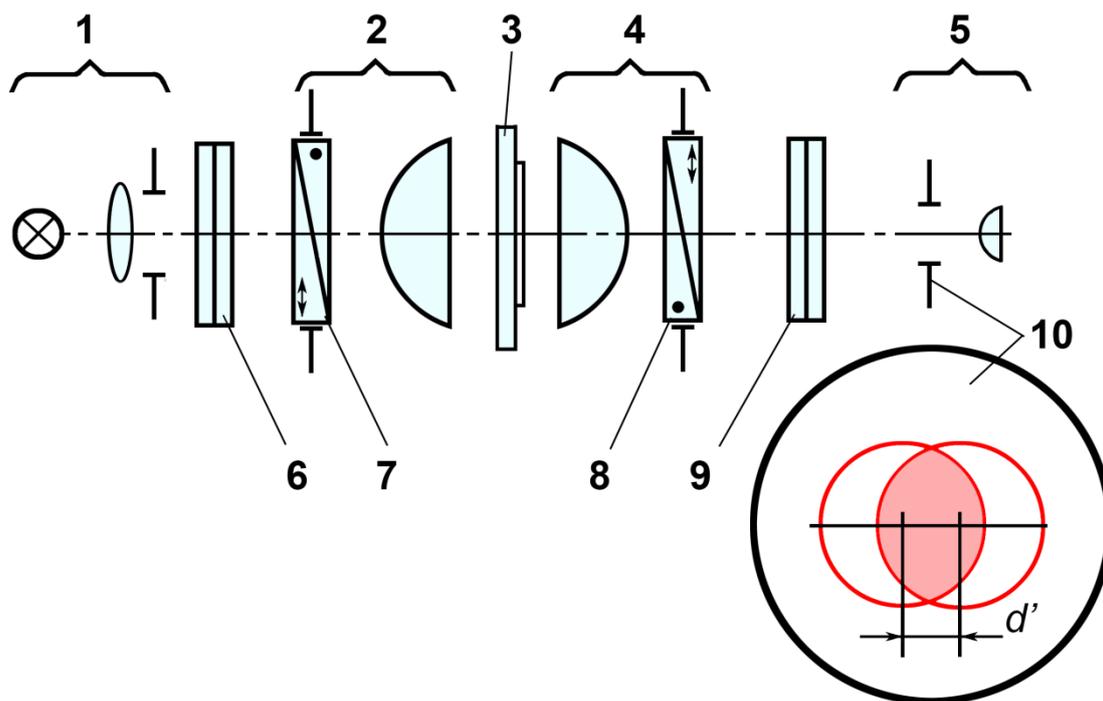


Рис. 5.7. Оптическая схема устройства ДИК в проходящем свете.

1 – осветитель; 2 – конденсор; 3 – препарат; 4 - объектив; 5 – окуляр; 6 - поляризатор; 7, 8 – призмы Волластона; 9 – анализатор; 10 - плоскость изображения; d' – расстояние между центрами двух перекрывающихся изображений объекта.

Препарат 3 помещают в интерферометр, состоящий из двух призм Волластона 7 и 8, поляризатора 6 и анализатора 9. Призма 7, расположенная в фокальной плоскости конденсора 2, делит каждый луч на два когерентных луча. Вторая призма 8 расположена в задней фокальной плоскости (в выходном зрачке) объектива 4. Конденсор 2 проецирует поверхность склейки призмы 7 в область склейки призмы 8, в результате чего лучи сводятся вместе. Объектив 4 создает в плоскости 10 два изображения объекта, в формировании которых участвуют только когерентные лучи, пропущенные анализатором 9. В плоскости 10 контраст псевдо-рельефного изображения проявляется в области перекрытия двух изображений как результат их интерференции. Величину раздвоения этих изображений выбирают меньше величины разрешающей способности применяемого объектива. Это означает, что при условии $A = A_{об} = A_{кон}$ в поле зрения 10 величина раздвоения изображения d' соответствует выражению:

$$d' < 0,61\lambda \frac{V}{A},$$

где A и V – апертура и увеличение объектива соответственно.

Данное устройство является светосильным, так как позволяет работать с полной апертурой конденсора. Необходимым условием работы ДИК является совпадение плоскостей локализации интерференционных

полос каждой призмы с фокальными плоскостями объектива 4 и конденсора 2.

5.3.1. Действие призмы Волластона как светоделителя

В микроскопии призмы Волластона преимущественно изготавливают из кварца, представляющего собой положительный одноосный кристалл с разностью показателей преломления около 0,6% [3]. Рассмотрим ход лучей, перпендикулярных входной грани призмы. В месте склейки клиньев происходит расщепление луча на малый расчетный угол, величина которого определяется углом клина θ (рис. 5.8.). Угол расхождения остается постоянным для всех лучей, входящих в призму. Однако при выходе из призмы разность фаз δ между обыкновенным и необыкновенным лучами зависит от расстояния между лучом и оптической осью микроскопа. Оптическая ось микроскопа направлена перпендикулярно входной грани призмы и проходит через клинья в том месте, где их геометрические расстояния вдоль оси равны.

Рассмотрим три луча, входящие в нижний клин призмы: *a*) слева от центра призмы; *б*) по центру призмы (вдоль оптической оси микроскопа); *в*) справа от центра призмы [3]. Поскольку для луча, идущего вдоль оптической оси (рис. 5.8.б), геометрические расстояния в обоих клиньях равны, то в результате, учитывая малую величину угла клина θ , обыкновенный и необыкновенный лучи выходят из призмы взаимно ортогональными с разностью фаз $\delta = 0$. Лучи, пересекающие призму вне центра, проходят неравные расстояния в каждом клине (больше либо в нижнем клине, либо в верхнем). В случаях (*a*) и (*в*) это приводит к появлению разности фаз $\delta \neq 0$, причем с разными знаками. На рисунке плоскость локализации интерференционных полос показана горизонтальной пунктирной линией (смещение положения плоскости локализации показано преувеличенно большим; в действительности из-за малой величины угла θ это смещение мало).

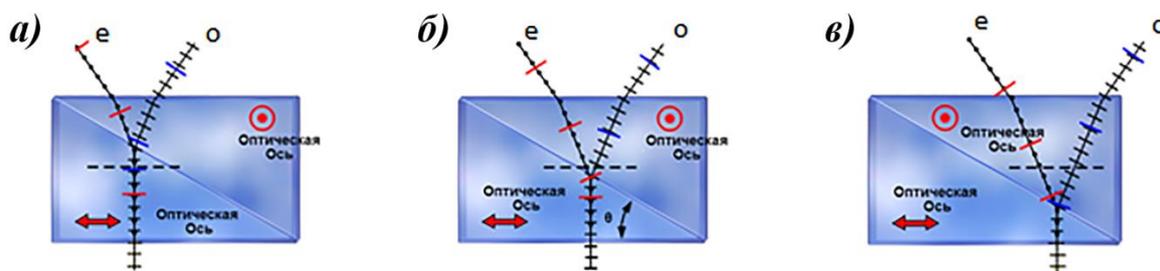


Рис. 5.8. Положение плоскости локализации интерференционных полос в зависимости от расстояния между лучом и центром призмы Волластона [3]. Направление оптической оси отдельных клиньев обозначено стрелкой в нижнем клине и мишенью «бычий глаз» в верхнем клине. Плоскость локализации обозначена горизонтальной пунктирной линией; *o* и *e* – обыкновенная и необыкновенная волны, соответственно.

На рис 5.9.а. изображены скрещенные поляризатор 1 и анализатор 3, между которыми установлена призма Волластона под углом 45° к направлению пропускания поляризатора.

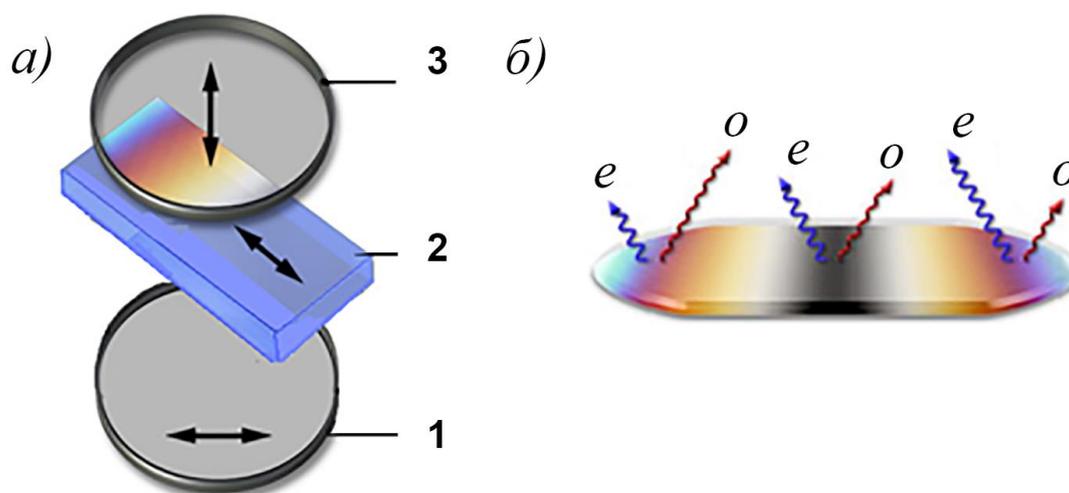


Рис. 5.9. Ориентация призмы Волластона (а) и вид интерференционной картины (б) [3].

а) 1 – поляризатор; 2 – призма Волластона; 3 – анализатор;

б) *o* и *e* – обыкновенная и необыкновенная волны соответственно.

Стрелки на поляризаторе 1 и анализаторе 3 указывают направление пропускания; стрелка на призме 2 указывает направление ее смещения.

На рис 5.9.б. изображен вид интерференционной картины, локализованной в области склейки клиньев. Условно волны представлены в виде синусоид, разность длин которых соответствует величине разности фаз δ . В центре обыкновенная и необыкновенная волны выходят с разностью фаз $\delta = 0$ (линейная поляризация) и гасятся анализатором, поэтому в центре картины находится темная полоса. Для боковых волн пройденные расстояния в призме позволяют одной из них (обыкновенной слева или необыкновенной справа) достичь границы раздела кварц-воздух раньше других, т.е. для этих пар волн $\delta \neq 0$. В результате при освещении белым светом в области склейки формируется картина, представляющая собой параллельные интерференционные полосы с преобладающей центральной темной полосой. По обе стороны от темной полосы наблюдают цветные полосы, как результат интерференции поляризованных лучей. (см. главу 7).

5.3.2. Настройка интерферометра

Настройка интерферометра заключается в ориентации поляризационных компонентов друг относительно друга. Для наглядности на рис. 5.10. представлены эти поляризационные компоненты без конденсора и объектива (конденсор и объектив

расположены между призмами, как изображено на рис. 5.7.). Ориентацию компонентов производят в определенном порядке.

1. Призмы 2 и 3 устанавливают между скрещенными поляризатором 1 и анализатором 4 под углом 45° к направлению пропускания поляризатора.
2. Призмы располагают параллельно друг другу и центрируют относительно оптической оси микроскопа.
3. Конденсор (на рисунке не показан) проектирует плоскость локализации интерференционных полос призмы 2 в плоскость локализации призмы 3.

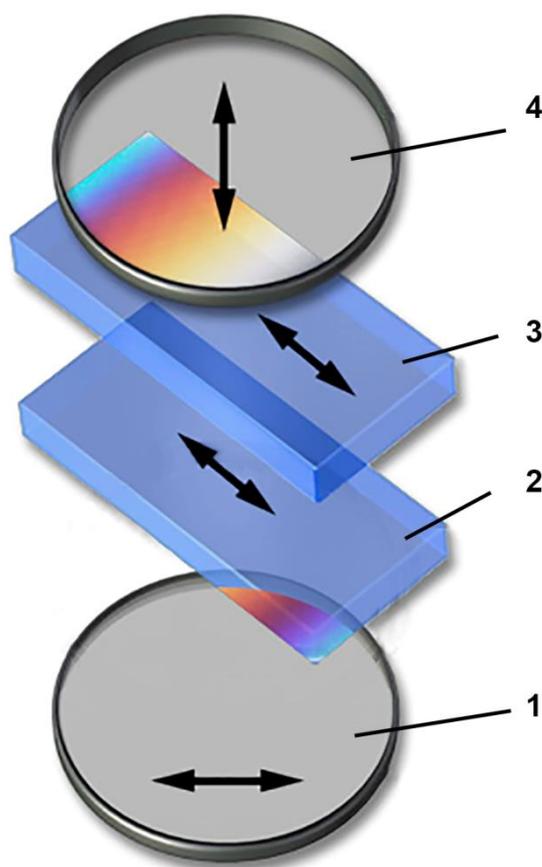


Рис. 5.10. Ориентация призм Волластона относительно скрещенных поляризатора и анализатора [3].

1 – поляризатор; 2 и 3 – призмы Волластона; 4 – анализатор.
Стрелки на поляризаторе 1 и анализаторе 4 указывают направление пропускания; стрелки на призмах 2 и 3 указывают направление смещения..

Перед анализатором 4 формируется комбинация из линейно и эллиптически поляризованных лучей, которые либо проходят через анализатор, либо им блокируются. Лучи, прошедшие через анализатор, формируют изображение объекта. [3].

5.3.3. Влияние на изображение смещения одной из призм Волластона

В качестве изотропного объекта возьмем капли масла на предметном стекле. Капли на стекле имеют форму полусферы [3]. В результате получим препарат с объектами известной формы. В устройстве ДИК анализатор не пропустит все лучи, прошедшие мимо капель, так как разность фаз между лучами не изменится. Фазовые изменения получают только лучи, прошедшие через капли. В этом случае изображения капель выглядят на темном фоне более светлыми.

На рис. 5.11. представлены два изображения капель масла. Изображение (а) получено при центрированном положении поляризационных призм. На темном фоне капли выглядят объемными в виде ямок со светлыми границами, а каждую каплю пересекает темная интерференционная полоса (на рисунке направленная вдоль светлой стрелки).

При смещении призмы Волластона Z в направлении, указанном стрелкой на рис. 5.11., освещенность фона меняется. По мере смещения призмы интенсивность фона постепенно переходит от черного к светло-серому (рис. 5.11.б.). Кроме того, положение интерференционной полосы нулевого порядка также смещается (светлая стрелка), что приводит к появлению ярких светлых участков и насыщенных теней на более светлом фоне. В результате капли выглядят выпуклыми.

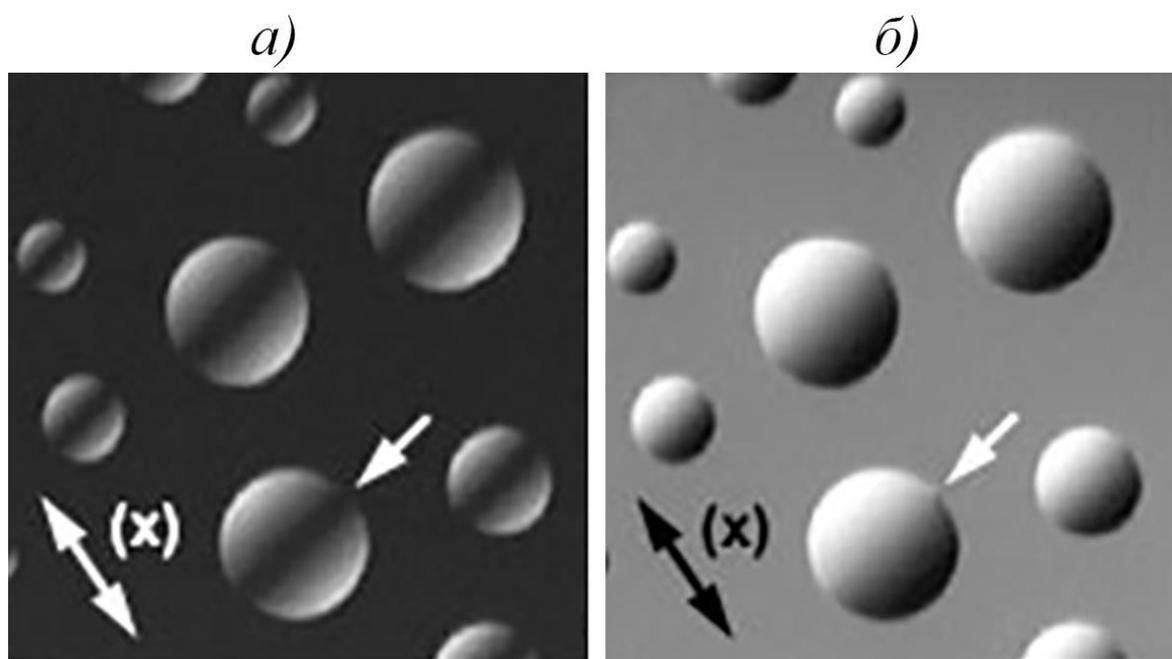


Рис.5.11. Изображения капель масла на предметном стекле, полученные методом ДИК. [3].

а) точная центровка призм Волластона; б) смещение объективной призмы Волластона. Двойной стрелкой (x) обозначено направление смещения объективной призмы Волластона; одинарной стрелкой – изменение вида контура капли.

Изображения капль на рисунках (а) и (б) выглядят псевдо-рельефными, однако трехмерный вид соответствует только фазовым градиентам, и его не следует отождествлять с фактической геометрией объекта [3].

5.4. Оптическое окрашивание изображения с помощью компенсатора Сенармона

Вместо смещения объективной призмы Волластона для решения той же задачи применяют компенсатор Сенармона. Компенсатор позволяет осуществлять *оптическое окрашивание* изображения за счет введения дополнительной разности фаз между интерферирующими лучами еще до их входа в препарат. Без оптического окрашивания изображения объектов имеют ограниченный диапазон оттенков серого цвета.

На рис. 5.12. представлена ориентация поляризационных компонентов интерферометра и компенсатора Сенармона. Компенсатор Сенармона состоит из поляризатора 1 и фазовой пластинки 2. Его устанавливают перед конденсорной призмой 3. Для введения разности хода поляризатор 1 должен иметь возможность поворачиваться вокруг своей оси на угол $\pm 45^\circ$, при этом фазовая пластинка 2 ($\lambda/4$) остается неподвижной. Поворот на $\pm 45^\circ$ вызывает изменение разности хода на $\Delta = \pm \lambda/4$.

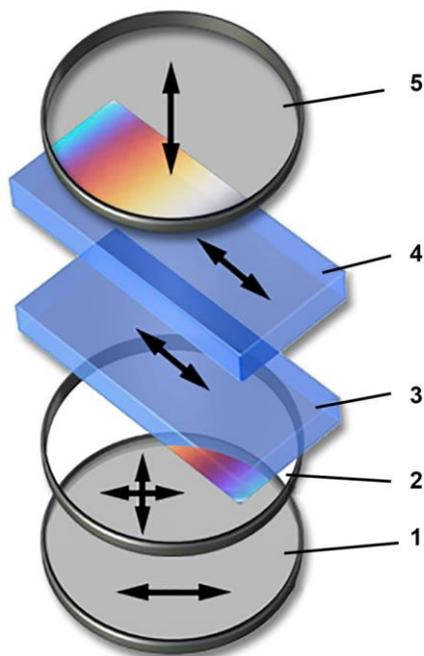


Рис. 5.12. Расположение и ориентация призм Волластона и компенсатора Сенармона [3].

1 и 2 – компенсатор Сенармона; 3 и 4 – призмы Волластона; 5 – анализатор.

На 1 и 5 стрелками указаны направления пропускания; на 2 стрелками обозначены направления главных осей; на 3 и 4 стрелки указаны направления смещения призм.

Из компенсатора выходят линейно- или эллиптически-поляризованный свет в зависимости от ориентации поляризатора относительно пластинки. Вращение поляризатора в одном направлении создает правосторонний эллиптически поляризованный свет, а в другом – левосторонний. Напоминаем, что эллиптически поляризованный свет представляют как сумму двух когерентных линейно-поляризованных и взаимно ортогональных волн с разностью фаз δ между ними.

При введении фазовой пластинки $\lambda/4$ объект и фон приобретают интерференционные цвета, аналогичные цветам, наблюдаемым в поляризационной микроскопии. Объект и фон становятся оптически окрашенными с переходом окраски от серого через белый, желтый, красно-синий и более высокие порядки. Оптическое окрашивание создает красивые и яркие изображения, но они имеют ограниченное применение для научных целей. Обычно оптическое окрашивание образца находится в диапазоне разности хода от $\lambda/20$ до $\lambda/4$ [3].

5.5. Введение в компенсатор Сенармона дополнительной одноволновой фазовой пластинки

Оптическое окрашивание осуществляют введением дополнительной одноволновой фазовой пластинки (λ), установленной после компенсатора Сенармона в определенном фиксированном положении [3]. Поворот поляризатора на $\pm 45^\circ$ вызывает изменение разности хода на $\Delta = \lambda \pm \lambda/4$.

Пластинка рассчитана таким образом, что при ее введении через анализатор проходят красные и синие лучи, но не проходят зеленые. В результате синие и красные лучи смешиваются, образуя пурпурный цвет. Вращение поляризатора дает быстрое изменение цвета в структурах объекта. Этот метод полезен для оптического окрашивания объектов с высоким показателем преломления, таких как клеточные мембраны, ядра и т.д. [3].

На рис. 5.13. представлены оптически окрашенные изображения трех биологических объектов. В верхнем ряду изображения (*a*, *b*, *d*) получены с применением компенсатора Сенармона. Объекты выглядят рельефными и слегка окрашенными. Во втором ряду изображения (*b*, *z*, *e*) получены с дополнительной фазовой пластинкой λ . Изображения (*b*) и (*z*) оптически окрашены в красный и пурпурный цвета, но менее рельефные. Изображение толстого среза ткани почки мыши (*e*) оптически окрашено в оранжевый цвет, но выглядит по сравнению с (*d*) менее рельефным, причем холмики на изображении (*d*) стали ямками на изображении (*e*).

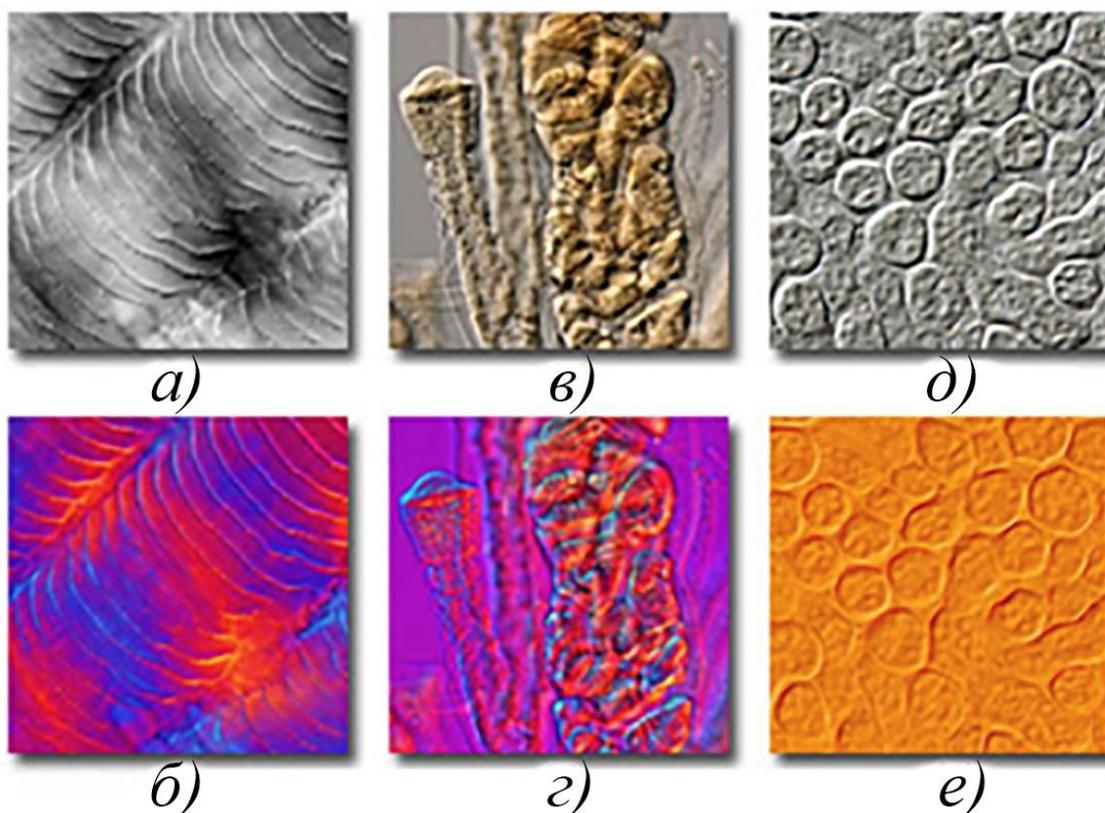


Рис. 5.13. Оптически окрашенные изображения биологических объектов, полученные с компенсатором Сенармона (*a, в, д*) и дополнительной фазовой пластинкой λ (*б, з, е*) [3].

a и *б* – бороздки в чешуе гребневидной рыбы; *в* и *з* – полип обелии гидроидной; *д* и *е* – толстый срез ткани почки мыши.

5.6. Применение двулучепреломляющей призмы Номарского

Разработчики метода ДИК столкнулись с трудностью использования призмы Волластона со стандартными объективами микроскопа. У призмы Волластона плоскость локализации интерференционных полос находится между клиньями, т.е. внутри призмы. Проблема возникает из-за того, что эта плоскость локализации должна совпадать с задней фокальной плоскостью объектива. Задняя фокальная плоскость стандартных объективов находится, как правило, внутри его корпуса за резьбовым соединением. Кроме того, различные объективы отличаются местом расположения фокальной плоскости. Отсюда следует необходимость разрабатывать специальные объективы для метода ДИК, что не устраивает ни пользователя, ни разработчика.

Для решения этой задачи Ж. Номарский (рис. 5.14) в конце 1950-х годов предложил вместо традиционной призмы Волластона использовать модифицированную призму, названную впоследствии призмой Номарского [19].



Ж. Номарский (G. Nomarski),
1919-1997



Л.А. Федин,
1929 – 1981

Рис. 5.14. Ученые-изобретатели модифицированной призмы Волластона с вынесенной плоскостью локализации интерференционной картины.

Одновременно и независимо от Номарского подобная призма была предложена Л.А. Фединым [20]. Выпускник ЛИТМО Федин работал в лаборатории микроскопии ГОИ им. С.И. Вавилова, которая входила в состав оптико-механического отдела под руководством академика Линника. Федин подал заявку на регистрацию изобретения, которая в те времена очень долго оформлялась. Исторически сложилось так, что название призмы связано только с именем Номарского, хотя по справедливости она должна называться призмой Номарского-Федина.

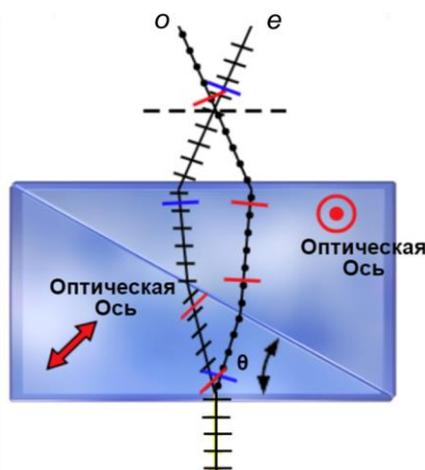


Рис. 5.15. Положение плоскости локализации интерференционных полос в призме Номарского [3].

Оптические оси клиньев призмы обозначены наклонной стрелкой в нижнем клине и мишенью «бычий глаз» в верхнем клине. Плоскость локализации обозначена горизонтальной пунктирной линией.

Призма Номарского, как и призма Волластона, состоит из двух склеенных кристаллических кварцевых клиньев. Один из клиньев идентичен клину призмы Волластона, а второй клин отличается ориентацией оптической оси кристалла. Ось наклонена под определенным рассчитанным углом к входной грани нижнего клина. После склейки клиньев плоскость локализации интерференционных полос находится вне призмы, как показано на рисунке 5.15.

Положение плоскости локализации призмы Номарского можно регулировать в диапазоне нескольких миллиметров, изменяя угол наклона оптической оси в нижнем клине [3, 21].

5.7. Сравнение методов фазового контраста и ДИК

Часто между собой сравнивают два метода: фазовый контраст и ДИК. С теоретической точки зрения механизмы образования контрастного изображения в этих методах различные.

В методе фазового контраста вносят изменения в *первичное изображение*, изменяя фазу нулевого порядка с помощью фазового кольца в объективе (изложение теории Аббе см. в [1]). В методе ДИК воздействуют на *вторичное* (неконтрастное) *изображение* объекта путем наложения дополнительной световой волны (так называемой волны сравнения), от интерференции с которой изображение становится контрастным, а в некоторых случаях цветным [2].

При реализации метода фазового контраста в зрачке конденсора устанавливают кольцевую диафрагму, с помощью которой объект освещают со всех сторон, и его вращение на столике микроскопа не влияет на контраст изображения. В методе ДИК контраст получают за счет интерференции двух изображений, которые смещают относительно друг друга в определенном направлении. Поэтому в некоторых случаях вид псевдо-рельефного изображения зависит от ориентации объекта. Иногда поворот столика на 180° превращает холм в ямку или наоборот. Метод не подходит для точного измерения геометрических высот и глубин [3].

В фазовом контрасте из-за дифракции на фазовом кольце появляется артефакт в виде ореола вокруг изображения, кроме того, контраст зависит от размеров объекта. В противоположность этому, ДИК одинаково хорошо передает как плавные, так и резкие изменения оптической толщины. Распределение освещенности в изображении зависит только от разности фаз, вносимой объектом, и не зависит от его размеров. В методе ДИК ореолы вокруг изображения объекта отсутствуют [14].

Заключение

Рассмотренные методы контрастирования объединяет то, что они реализуются за счет осветительной системы микроскопа без непосредственного воздействия на сам объект и связаны с апертурными диафрагмами оптической системы.

Эти методы являются качественными и имеют как преимущества, так и недостатки. Например, преимущество методов косоугольного освещения и темного поля в проходящем свете состоит в том, что они не требуют специальных оптических компонентов, но для реализации темного поля в отраженном свете необходим специальный эпиобъектив. В фазовом контрасте также применяют специальные фазовые объективы, кроме случая вынесенного зрачка, однако система вынесенного зрачка сложна сама по себе. Техника настройки ДИК трудна и кропотлива из-за наличия кристаллических призм и других поляризационных компонентов, однако только ДИК позволяет работать с максимальным разрешением микроскопа, т.е. с полной апертурой конденсора, в то время как остальные методы работают за счет снижения разрешения.

Помимо рассмотренных основных методов контрастирования, существует целый ряд методов, применяемых в световой микроскопии. Как правило, эти методы представляют собой комбинирование основных методов контрастирования и предназначены для исследования конкретной группы объектов. К таким методам, например, относятся:

- Varel-контраст, сочетающий в себе элементы фазового контраста и косоугольного освещения;
- модуляционный контраст Хоффмана – разновидность метода косоугольного освещения, применяемый в основном для изучения биологических объектов в пластиковых чашках Петри;
- освещение по Рейнбергу – частный случай темнопольного метода, в котором используется цветной светофильтр;
- PlasDIC – модификация метода ДИК, предназначенная для изучения биологических объектов в пластиковой посуде на инвертированных микроскопах;
- аностральный метод – разновидность метода фазового контраста.

Контрольные вопросы

1. С какой целью применяется призма Волластона? От какой характеристики объектива зависит выбор параметров призмы?
2. Какие дополнительные компоненты вводят в оптическую схему микроскопа для работы по методу ДИК?

Глава 6. ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Поляризационная микроскопия предназначена для изучения *анизотропных* объектов в поляризованном свете. Термин «анизотропия» (от греч. неравное направление) означает различие свойств среды в различных направлениях внутри этой среды. Под *оптической анизотропией* понимают различие оптических свойств среды по различным направлениям. В анизотропной среде поляризованный свет претерпевает изменения, по которым определяют оптические характеристики исследуемого объекта. К таким характеристикам относятся параметры *двулучепреломления*, *вращение плоскости поляризации*, наличие и ориентация *оптических осей*, *дихроизм* (*плеохроизм*).

Прежде чем перейти к рассмотрению принципиальной схемы поляризационного микроскопа и режимов ее работы, напомним значения некоторых используемых терминов. Такие термины, как поляризованный свет (линейный, эллиптический и круговой) и двулучепреломление, изложены в главе 5. Приведем значения следующих терминов: дихроизм, вращение плоскости поляризации и интерференция поляризованных лучей.

Дихроизм (или *плеохроизм*) – различное поглощение света веществом в зависимости от ориентации электрического вектора световой волны (*анизотропия поглощения*). Поглощение зависит от длины волны, поэтому дихроичные вещества оказываются различно окрашенными по разным направлениям наблюдения, откуда и название «дихроизм» (по греч. «двухцветность»). Правильнее употреблять термин «плеохроизм» (по греч. «многоцветность») [18].

В кристаллооптике различают две основные окраски для одноосных кристаллов (вдоль оптической оси и перпендикулярно к ней) и три основные окраски – для двуосных кристаллов. Например, турмалин относится к дихроичным одноосным кристаллам, а уксуснокислая медь – к плеохроичным двуосным кристаллам. Примером практического применения дихроичного вещества является *поляроид*. Частным случаем дихроизма является так называемый *круговой дихроизм* – различное поглощение света, поляризованного по кругу вправо и влево. Круговой дихроизм имеет место при отсутствии у анизотропного вещества центра симметрии. Наличие кругового дихроизма связано с *оптической активностью*.

Вращение плоскости поляризации света – физическое явление, заключающееся в повороте электрического вектора линейно-поляризованной волны при ее прохождении через анизотропную среду. Это явление было открыто французским ученым Араго в 1811 году. Вращение плоскости поляризации связано с различием показателей

преломления для право- и лево-поляризованных по кругу лучей. Угол поворота плоскости поляризации прямо пропорционален длине пути и зависит от рода среды, в которой распространяется свет.

Интерференция поляризованных лучей – явление, возникающее при сложении когерентных поляризованных световых волн. Максимальный контраст интерференционной картины наблюдают при интерференции волн одной формы поляризации (линейной, круговой, эллиптической) с совпадающими азимутами. Интерференция никогда не происходит, если линейно-поляризованные волны ортогональны. В общем случае, проходя через анизотропную среду, световая волна расщепляется на две когерентные ортогональные волны, распространяющиеся с различной скоростью. Для получения интерференционной картины одну из этих волн преобразуют таким образом, чтобы азимуты обеих волн совпали, или из каждой волны выделяют составляющие одной формы поляризации с совпадающими азимутами [18].

6.1. Ортоскопический и коноскопический методы исследования анизотропных объектов

Интерференцию поляризованных лучей изучают двумя способами: ортоскопическим и коноскопическим. При ортоскопическом методе объект помещают в параллельный пучок линейно-поляризованного света. На рис. 6.1. представлена схема поляриметра, предназначенного для измерения угла вращения плоскости поляризации вещества, обладающего оптической активностью.

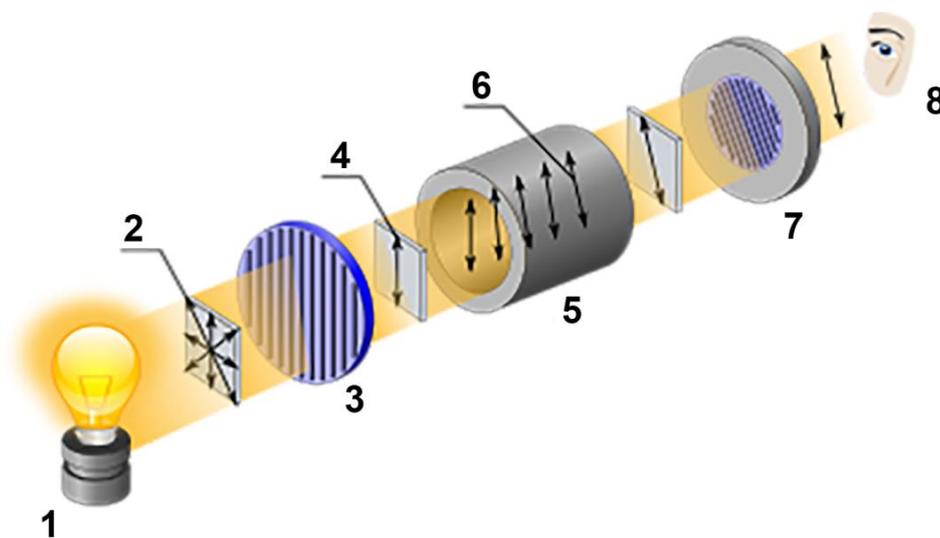


Рис. 6.1. Схема поляриметра для наблюдения оптической активности вещества.

1 – источник света, 2 – неполяризованный свет, 3 – поляризатор, 4 – поляризованный свет, 5 – кювета с раствором вещества, 6 – оптическое вращение 30° , 7 – анализатор, 8 – наблюдатель [4].

При коноскопическом методе объект помещают в сходящемся пучке линейно-поляризованного света для исследования коноскопических фигур (интерференционных картин), которые формируются в фокальной плоскости собирающей линзы. По этим фигурам определяют ориентацию осей и знак кристалла, наличие вращения плоскости поляризации и напряжения в оптических средах и т.п. На рис. 6.2. представлены коноскопические фигуры напряжений в стеклянной заготовке зеркала при двух положениях поляризатора и анализатора – параллельном слева и скрещенном справа.

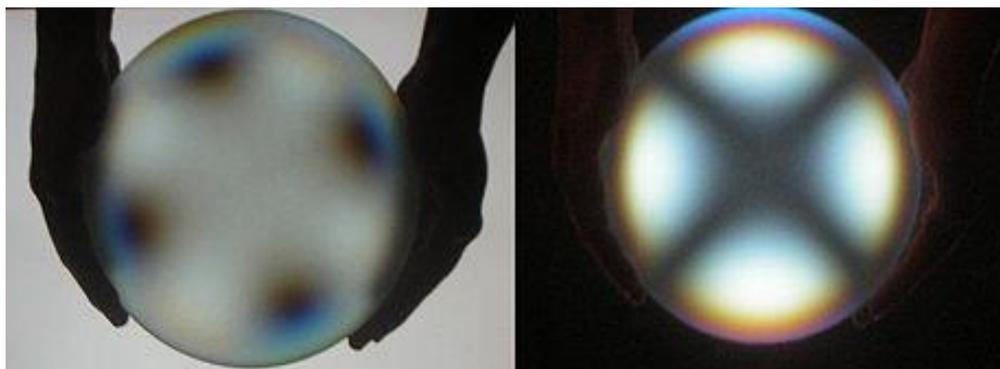


Рис. 6.2. Напряжения в стеклянной заготовке зеркала для телескопа [4].

6.2. Принцип работы поляризационного микроскопа

Объекты поляризационной микроскопии исследуют как в проходящем, так и в отраженном свете, но мы будем рассматривать только поляризационные микроскопы проходящего света.

В оптической схеме поляризационного микроскопа устанавливают два обязательных компонента – поляризатор и анализатор (рис. 6.3.). Поляризатор 3 помещают в осветительную систему между коллектором 2 и конденсором 4, а анализатор 8 – за объективом 6.

В поляризационном микроскопе применяют два основных метода исследования: ортоскопический и коноскопический.

6.2.1. Ортоскопический метод

На рис. 6.3. представлены схема и ход лучей при ортоскопическом методе исследования. Предварительно освещение настраивают по методу Кёлера. При этом освещение объекта 5 должно быть максимально приближено к параллельному ходу лучей, так как наклонные лучи могут исказить результаты исследования. Для этой цели уменьшают диаметр апертурной диафрагмы конденсора 4, понимая, что при этом снижается разрешающая способность микроскопа. Уменьшение апертурной диафрагмы означает, что источник света приближают к точечному источнику. Для качественных исследований используют анализатор 8, а

для проведения количественных измерений, кроме анализатора, в оптическую схему вводят компенсатор 7.

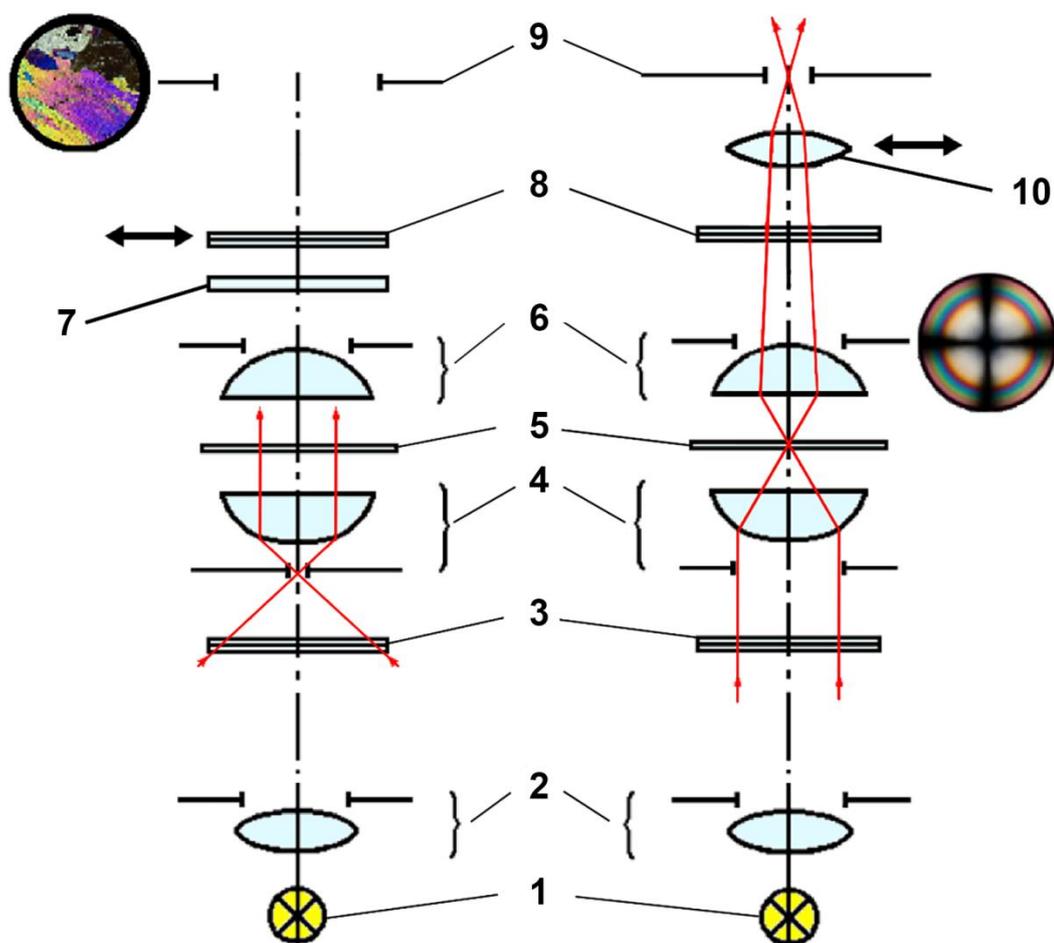


Рис.6.3. Оптическая схема поляризационного микроскопа проходящего света при ортоскопическом (слева) и коноскопическом (справа) наблюдении объекта.

1 – источник света, 2 – коллектор, 3 – поляризатор, 4 – конденсор, 5 – препарат, 6 – объектив, 7 – компенсатор, 8 – анализатор, 9 – полевая диафрагма, 10 – линза Бертрана.

Определение параметров двулучепреломления производят с помощью компенсаторов различного устройства. Простейшим из них является кварцевый клин, одна из граней которого вырезана параллельно оптической оси кварца. Например, максимальная толщина клина может составлять около 0,5 мм, длина – порядка 50 мм, а угол – около 0,5°. Такой клин вклеивают между двумя стеклянными пластинками. При скрещенных поляризаторе и анализаторе вдвигают клин над объектом, начиная с тонкого конца. Компенсацию двулучепреломления, вносимого объектом, фиксируют положением клина при максимальной потемнении. После удаления объекта по цвету клина в том месте, где была достигнута максимальная темнота, определяют разность хода [23]. На рис. 6.4.

представлен внешний вид кварцевого клина, который позволяет компенсировать разность хода до 6λ , и компенсатора Берекы, предназначенного для измерения разности хода до 1800 нм .

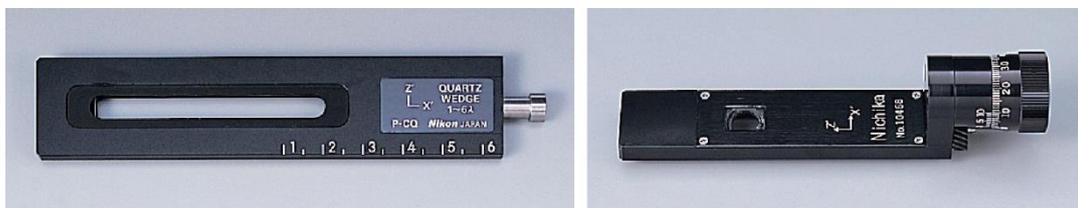


Рис. 6.4. Оптические компенсаторы фирмы Nikon, слева – кварцевый клин, справа – компенсатор Берекы.

Компенсатор Берекы состоит из тонкой кальцитовой пластинки, вырезанной перпендикулярно оптической оси. Его вводят над исследуемым объектом (при скрещенных поляризаторе и анализаторе) Пластинку поворачивают вокруг горизонтальной оси, добиваясь появления максимального потемнения. Отсчет угла поворота пластинки производят по барабану, а затем определяют искомую разность хода.

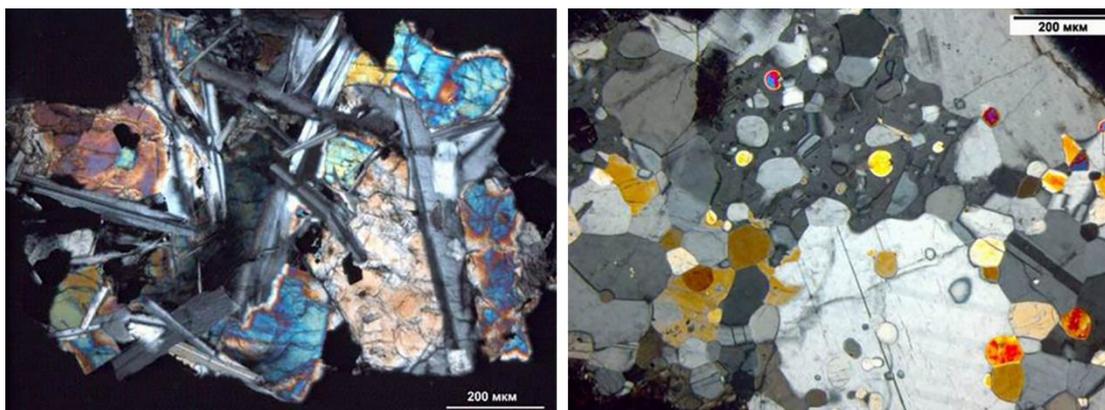


Рис. 6.5. Изображения двух шлифов лунных пород из коллекции РАН: долерит (слева) и гранулит (справа) [24].

На рис. 6.5. представлены изображения двух шлифов лунных пород из коллекции РАН, полученные в проходящем свете при скрещенных поляризаторе и анализаторе. Шлифы представляют собой тонкую пластинку горной лунной породы толщиной около 40 мкм .

6.2.2. Коноскопический метод

На рис. 6.3. представлены схема и ход лучей при коноскопическом методе исследования. В этом случае применяют высокоапертурный объектив 6 и открывают апертурную диафрагму конденсора 4, что позволяет препарат 5 освещать наклонными пучками лучей.

После настройки освещения по Кёлеру в оптическую систему вводят специальную линзу 10 – так называемую линзу Бертрана. Линза Бертрана вместе с окуляром представляет собой вспомогательный

микроскоп, позволяющий рассматривать выходной зрачок объектива. При этом определенный участок препарата, например, зерно минерала, выделяют с помощью полевой диафрагмы.

В коноскопическом режиме используют протяженный источник света, а не точечный, как в ортоскопическом. К изображению источника предъявляют дополнительные требования – максимальное приближение излучения к естественному свету и равномерное заполнение зрачка конденсора. Для этой цели в осветительную систему помещают матовое стекло (или растр), а зрачок рассматривают как равномерно светящуюся плоскость. Через объект проходят широкие пучки параллельных лучей разного наклона, а не один пучок, параллельный оси микроскопа, как в ортоскопии. Каждый параллельный пучок объектив фокусирует в точку в плоскости выходного зрачка. Совокупность таких точек составит интерференционную картину (коноскопическую фигуру). При скрещенных поляризаторе и анализаторе вид этой картины определяют свойства особых поверхностей анизотропного объекта.

Коноскопическая картина представляет собой систему интерференционных полос – изогири и изохром. Изогиры – черные полосы, соответствующие тем направлениям, для которых колебания волн параллельны пропусканию поляризатора. Изохромы – полосы одинаковой интерференционной окраски (в белом свете). Каждой полосе соответствует совокупность направлений, вдоль которых лучи имеют одинаковую разность хода.

В качестве примера рассмотрим формирование коноскопических фигур одноосного и двуосного кристаллов.

1. *Коноскопическая фигура одноосного кристалла.* Пусть исследуемый объект представляет собой пластинку одноосного кристалла, вырезанную перпендикулярно оптической оси. Поверхности равных разностей хода представлены на рис. 6.6.а.

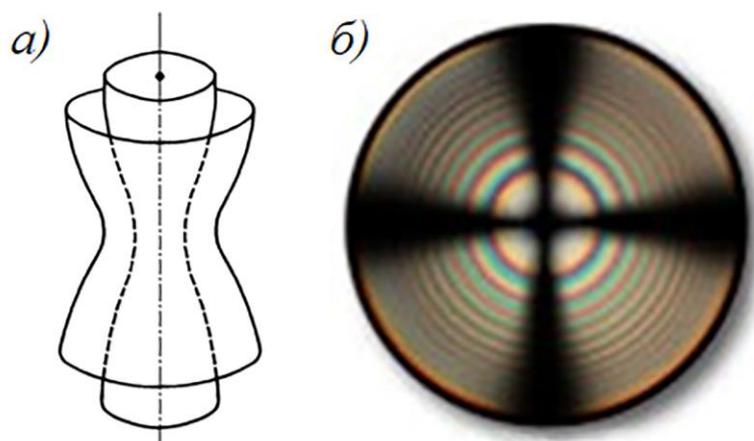


Рис. 6.6. Поверхности равных разностей хода одноосного кристалла (а) и коноскопическая картина (б).

Ближайшая к оси кристалла поверхность соответствует разности хода в одну волну (λ), следующая поверхность проходит по точкам с разностью хода в две волны (2λ) и т.д. На рисунке изображены две ближайшие к оптической оси поверхности. Каждая из поверхностей представляет собой поверхность вращения, поэтому и сечения, перпендикулярные к оптической оси, представляют собою систему концентрических окружностей [23].

В монохроматическом свете коноскопическая фигура представляет собой систему концентрических светлых и темных колец, пересеченных темным крестом с центром, совпадающим с центром колец. Если наблюдение производят в белом свете, то кольца приобретают радужную окраску (рис. 6.6.б). При вращении столика или смещении пластинки препаратомодителем вид интерференционной картины не меняется.

2. *Коноскопическая фигура двуосного кристалла.* Пусть исследуемый объект представляет собой пластинку двуосного кристалла, вырезанную перпендикулярно к острой биссектрисе оптических осей. Характерной особенностью семейства поверхностей равной разности хода является то, что в него входят две оси кристалла (рис. 6.7.а). В сечениях, перпендикулярных к острой биссектрисе, поверхности образуют семейство кривых, близких по форме к *овалам Кассини* (рис. 6.7.б).

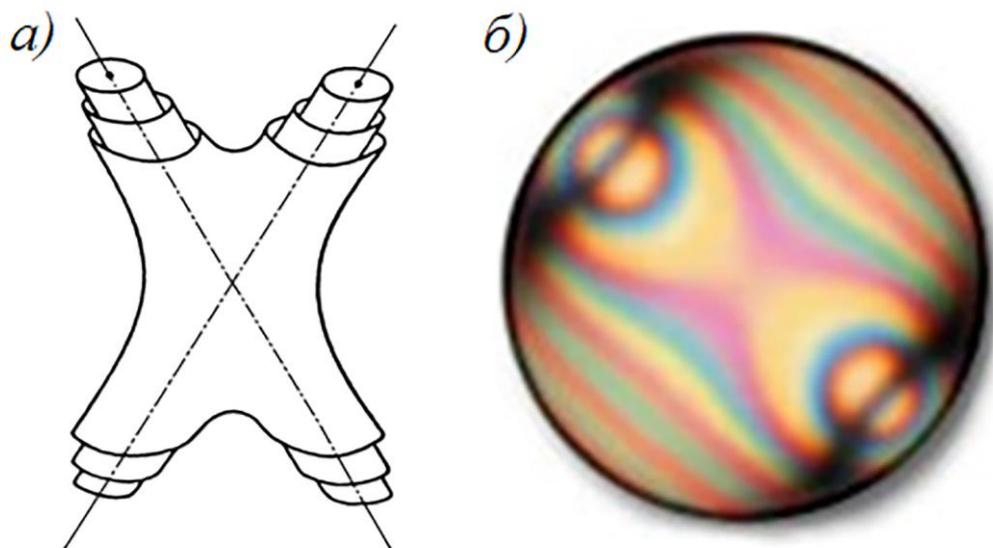


Рис. 6.7. Поверхности равных разностей хода двуосных кристаллов (а) и коноскопическая картина (б).

При скрещенных поляризаторе и анализаторе коноскопическая фигура в монохроматическом свете состоит из темных и светлых изохром, имеющих форму овалов Кассини, и темного креста. При вращении столика балки креста разъединяются, образуя пару непересекающихся изогир [23].

На рис. 6.8. представлены коноскопические фигуры двуосного кристалла (слюды) с соединенными и разъединенными балками креста.

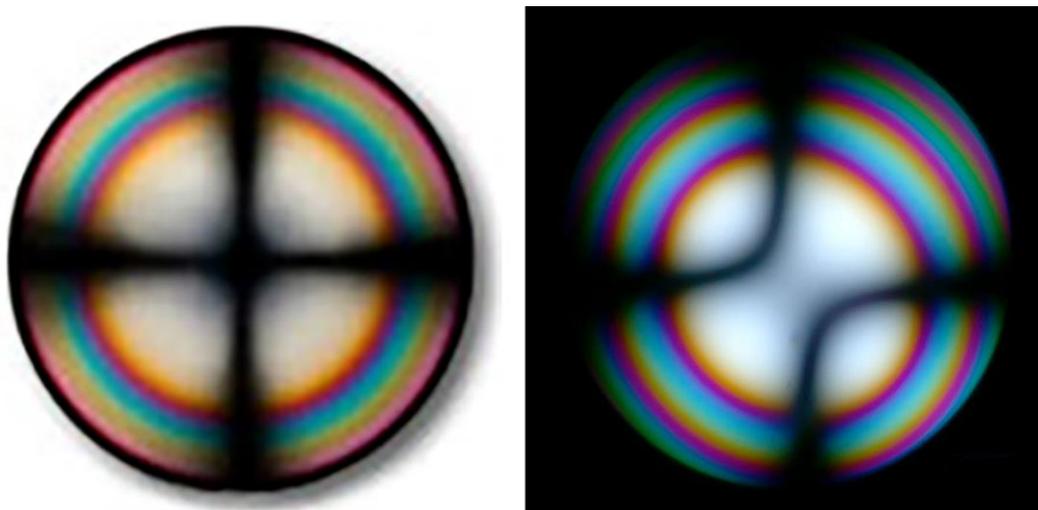


Рис.6.8. Коноскопические фигуры слюды с соединенными и разъединенными балками креста при различной ориентации слюды относительно направления пропускания поляризатора.

Коноскопические фигуры дают возможность определить:

- одно- или двуосный объект;
- знак двойного лучепреломления;
- ориентацию объекта и величину угла между оптическими осями.

6.3. Основные детали и узлы поляризационного микроскопа

На первый взгляд поляризационный микроскоп отличается от традиционного микроскопа только наличием поляризационных устройств: двумя линейными поляризаторами, фазовыми пластинками, компенсаторами и т.д. Однако он предназначен для исследования *анизотропных* объектов, поэтому все оптические компоненты, кроме перечисленных, не должны влиять на поляризационные характеристики. К таким компонентам относятся предметные и покровные стекла, конденсор и особенно объектив, следовательно, эти компоненты не должны обладать собственным двулучепреломлением.

Измерения на поляризационном микроскопе зависят от взаимной ориентации объекта и поляризационных компонентов, точности отсчета углов поворота, поэтому к механическим узлам и к центрировке микроскопа в целом предъявляются повышенные требования. Если исследования связаны с цветовыми соотношениями, то следует обращать внимание на спектральный состав источника света. Обычно применяют лампы накаливания 50 и 100 Вт.

Перед проведением количественных измерений необходимо проверять скрещенность поляризатора и анализатора, направление

пропускания поляризатора, центрировку вращающегося столика относительно оси микроскопа и т.п.

В качестве примера на рис. 6.9. представлен общий вид поляризационного микроскопа проходящего света фирмы Nikon. На штативе микроскопа крепятся тубусная насадка, револьверное устройство, механизм грубой и точной подачи столика и осветитель.



Рис. 6.9. Поляризационный микроскоп фирмы Nikon.

6.3.1. Объективы и окуляры

Объективы. Одно из основных требований к объективам – отсутствие деформаций в стеклах (см. рис. 6.2.) и внутренних натяжений в линзовых компонентах, возникающих при креплении линз в оправы. Эти дефекты приводят к появлению двулучепреломления. Фирма контролирует объективы, которыми комплектует поляризационные микроскопы, и отсутствие анизотропии указывает на корпусе объектива буквами «П» или «Pol». На рис. 6.10. представлен комплект объективов-ахроматов серии CFIP фирмы Nikon.

Окуляры. Один из окуляров бинокулярной насадки должен содержать перекрестие (иногда шкалу с перекрестием или сетку), расположенное в плоскости полевой диафрагмы. Перекрестие определяет центр поля зрения и используется при центрировке микроскопа. Окуляр с перекрестием содержит винтовой механизм, с помощью которого микроскопист получает резкое изображение перекрестия. Второй окуляр, находящийся в бинокулярной насадке, оснащен диоптрийной

настройкой, которую следует выполнять с учетом зрения экспериментатора.



Рис. 6.10. Комплект объективы для поляризационной микроскопии фирмы Nikon.

6.3.2. Тубусная насадка

Тубусная насадка (рис. 6.11.) крепится на штативе поляризационного микроскопа.



Рис. 6.11. Тубусная насадка поляризационного микроскопа фирмы Nikon.

Насадка содержит:

- бинокляр;
- фокусируемую линзу Бертрана, которая вводится и выводится из хода лучей;
- встроенный анализатор с вращающимся на 360 градусов барабаном (цена деления $0,1^\circ$);
- направляющую для фазовой пластинки $1/4\lambda$, клина или компенсатора.
- пятигнездный револьвер с механизмом центрировки объективов.

В направляющую прорезь вставлен компенсатор Сенармона. Каждый объектив в револьвере отдельно центрируется в своем гнезде с помощью специальных центрировочных ключей.

6.3.3. Столик и препаратодователь

Круглый предметный столик снабжен вращающимся диском. Диск имеет по окружности 360 делений, цена деления 1° . Два нониуса, закрепленные на неподвижной части столика, дают возможность производить отсчет углов поворота с точностью 6 минут. Вращение столика может быть застопорено с помощью винта. Диск столика имеет два отверстия для установки пружинящих клемм и три отверстия для установки препаратодателя.



Рис. 6.12. Столик LV100POL с пружинящими клеммами (слева) и препаратодатель (справа) для поляризационного микроскопа фирмы Nikon.

Диапазон перемещений накладного препаратодателя составляет 35×25 мм, а минимальный отсчет по нониусу – 0,1 мм. Препаратодатель крепится на столике винтами и вращается вместе с ним.

Заключение

Исследования объектов в поляризованном свете предъявляют повышенные требования к оптическим компонентам, механическим узлам микроскопа и к их взаимной ориентации.

Поляризационную микроскопию применяют в петрографии, минералогии, кристаллографии, углепетрографии, биологии, медицине, химии, криминалистике и т.д.

Контрольные вопросы

1. Какие объекты изучают с помощью поляризационного микроскопа?
2. Какие методы применяют в поляризационной микроскопии? В чем заключаются отличия в выборе параметров объектива и настройке освещения?
3. Какие дополнительные требования предъявляются к оптическим деталям поляризационного микроскопа?

Глава 7. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Интерференционный микроскоп представляет собой сочетание интерферометра и микроскопа. Интерферометры используются как измерительные приборы. Например, в научных целях их применяют для измерения длин волн спектральных линий, показателя преломления прозрачных сред, угловых размеров звезд и т.п., а в технических - для контроля качества оптических деталей и систем, качества обработки оптических и металлических поверхностей и т.д. [25, 26, 18]. Поэтому изначально интерференционные микроскопы разрабатывались для количественных исследований объектов интерферометрическими методами.

Любой элемент интерферометра может применяться в микроскопе, если он не нарушает условий его работы. Раздвоение и воссоединение интерферирующих световых пучков обычно осуществляют одним из трех способов: с помощью зеркальной и призмной систем, оптических элементов из двулучепреломляющих кристаллов и модифицированных интерферометров с применением метода сдвига волновых фронтов.

Существуют различные схемы интерференционных микроскопов отраженного и проходящего света, основанных на двухлучевой интерференции и интерференции поляризованных лучей. Рассмотрим оптические схемы и принцип действия интерференционных микроскопов, получивших наибольшее распространение, благодаря удачному сочетанию всех необходимых качеств. Однако, прежде чем перейти к рассмотрению принципиальных схем интерференционных микроскопов, напомним значения некоторых терминов и оптических схем интерферометров.

7.1. Общие сведения об интерферометрах и интерференционных картинах

В основе работы интерферометра лежит пространственное разделение пучка света с помощью какого-либо устройства для получения двух или более взаимно когерентных лучей, которые проходят различные оптические пути, а затем сводятся вместе для наблюдения результата их интерференции [18]. Можно сказать, что оптические схемы интерферометров отличаются способом формирования волны сравнения.

7.1.1. Интерференционные полосы, их ширина и форма

Работа на интерферометре сводится к измерению смещения или искривления полос (в интерференционных микроскопах используются только полосы, поэтому кольца рассматривать здесь не будем).

На рис. 7.1. представлена схема получения прямых интерференционных полос от двух источников света. Точечные источники S_1 и S_2 , разность фаз между которыми $\delta_0 = 0$, симметрично расположены относительно точки O на расстоянии a друг от друга. Экран находится на расстоянии L_0 от линии S_1S_2 , причем $a \ll L_0$. Разность хода Δ между двумя отрезками L_1 и L_2 в точке их пересечения в центре экрана под углом ω_0 также равна нулю ($\Delta = L_1 - L_2 = 0$). Через эту точку проходит светлая полоса нулевого порядка [25, 26].

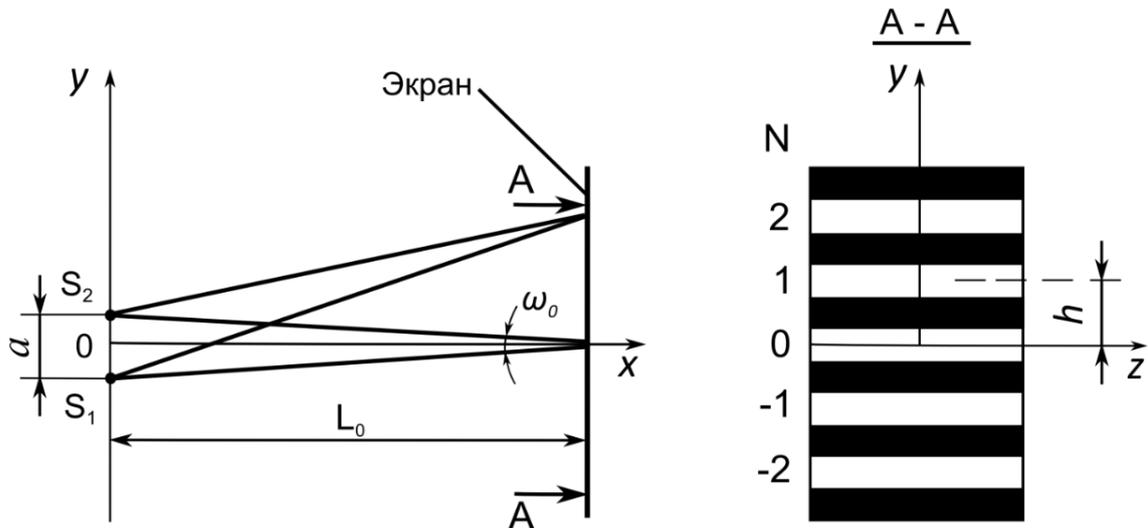


Рис. 7.1. Интерференционная картина на экране от двух источников света. S_1 и S_2 – точечные источники света; a – расстояние между источниками; L_0 – расстояние от источников до экрана; h – ширина полосы; N – порядок интерференции.

В плоскости экрана по обе стороны от нулевой полосы возникают прямые светлые и темные интерференционные полосы, направленные перпендикулярно линии S_1S_2 . Ширина полос h пропорциональна длине волны λ и обратно пропорциональна $\sin \omega$. При малых угла ω ширина полосы равна $h = \lambda / \sin \omega \approx \lambda / \omega$. Например, если $\omega = 1'$ ($3 \cdot 10^{-4}$ радиан) и $\lambda = 6 \cdot 10^{-4}$ мм, то $h = 2$ мм. Изменение Δ на длину волны λ вызывает перемещение полос на расстояние, равное ширине полосы h .

Приведем определения наиболее часто используемых терминов.

- *Оптическая длина пути l* – произведение расстояния, проходимого лучом в данной среде, на показатель преломления n этой среды (ln). Если луч проходит k сред с показателями преломления n_1, n_2, \dots, n_k , то суммарная оптическая длина пути:

$$L = \sum_1^k l_k n_k$$

- *Разность хода Δ двух лучей* – разность оптических длин L_1 и L_2 , проходимых этими лучами, $\Delta = L_1 - L_2$.

- *Порядок интерференции* N – отношение разности хода Δ к длине волны λ и равен $N = \Delta/\lambda$.
- *Разность фаз* двух колебаний $\delta = \varphi_1 - \varphi_2 = 2\pi\Delta/\lambda = 2\pi N$.
- *Ширина полосы* – расстояние h между серединами двух соседних полос. Переходу от одной полосы к соседней полосе соответствует изменение δ , равное 2π (или изменение Δ на длину λ), независимо от геометрической ширины полос.
- *Плоскость локализации интерференционной картины* – геометрическое место точек пересечения интерферирующих лучей.

На практике в белом свете интерференционная картина содержит 8 – 10 полос с центральной белой ахроматической полосой, легко отличимой от других окрашенных полос. Окраска остальных полос симметрична по отношению к центральной полосе [25, 26].

7.1.2. Когерентность

В интерференционных микроскопах в основном применяют некогерентные источники света, например, лампы накаливания, поэтому напомним некоторые понятия и термины, связанные с когерентностью [25, 26].

Колебания называются *когерентными*, если разность фаз δ между ними остается постоянной в течение времени наблюдения. Лампы накаливания можно рассматривать как совокупность элементарных источников света. Элементарный источник света (атом или молекула) излучает в течение короткого промежутка времени τ ($10^{-8} - 10^{-10}$ с). При этом начальная фаза каждого последующего излучения может иметь произвольное значение. Поэтому разность фаз колебаний независимых элементарных источников хаотически изменяется, т. е. при их сложении интерференция отсутствует. Такой источник света называют некогерентным.

Однако в интерферометрах происходит сначала разделение пучка лучей, вышедшего из некогерентного источника, на два пучка, а затем – их соединение. При этом фазы складываемых колебаний хаотически меняются через интервалы времени τ , но эти изменения происходят в обоих пучках по одинаковому закону, и разность фаз между ними сохраняется постоянной, т.е. эти колебания являются когерентными (если разность хода Δ не превышает расстояния $l = c\tau$, где c – скорость света в вакууме).

Время τ называют *временем когерентности*, а расстояние $l = c\tau$ – *длиной когерентности* излучения. Величины τ и l непосредственно связаны со спектральной шириной $d\lambda$ излучения.

Пространственная когерентность характеризует степень корреляции результатов интерференции в данной точке поля интерференции для разных точек протяженного источника [25, 26].

7.2. Оптические схемы двухлучевых интерферометров, применяемых в интерференционных микроскопах

При подготовке микроскопа к измерениям желательно иметь возможность получать интерференционные полосы в белом свете. Объясняется это тем, что в белом свете легче отличить нулевую ахроматическую полосу от других окрашенных полос. За ней очень удобно следить, особенно в тех случаях, когда в системе полос имеются резкие скачки или разрывы. Однако в этом случае к схеме и юстировке интерферометра предъявляют дополнительное требование: оптические длины двух ветвей должны быть равны друг другу для всех длин волн. Это требование разделяется на два: 1) в обеих ветвях должны быть равны между собой пути в воздухе; 2) стекла, находящиеся в двух ветвях интерферометра, должны иметь одинаковый показатель преломления и дисперсию, и их толщины должны быть равны между собой [25] Приведем несколько схем интерферометров.

7.2.1. Интерферометр Маха-Цендера

В 1891 году Цендер и в 1892 году Мах независимо друг от друга предложили интерферометр, принципиальная схема которого представлена на рис. 7.2.

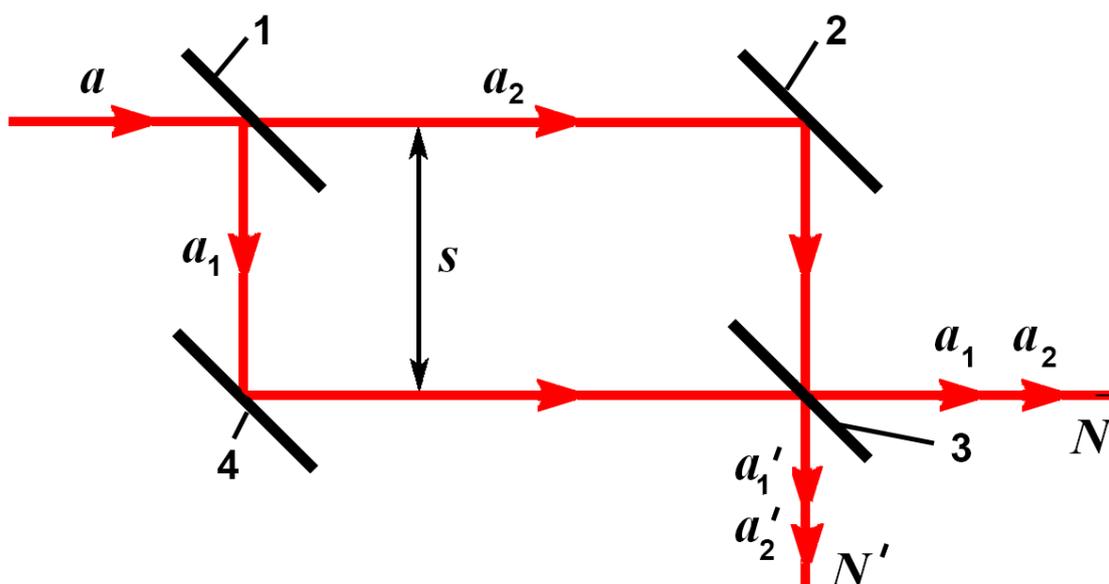


Рис. 7.2. Принципиальная схема интерферометра Маха-Цендера [26].

1 и 3 – полупрозрачные пластины; 2 и 4 – зеркала; s – расстояние между лучами.

Параллельный пучок лучей a , входящий в интерферометр, разделяется полупрозрачной пластиной 1 на пучки a_1 и a_2 , которые после отражения от зеркал 2 и 4 вновь соединяются полупрозрачной пластиной 3 и интерферируют. Интерференционную картину наблюдают в направлениях N или N' .

На рисунке изображено «начальное» положение зеркал и пластинок, при котором лучи a_1 и a_2 после разделения сначала идут параллельно, а затем соединяются и распространяются в одном направлении с нулевой разностью хода. При этом в любой плоскости, перпендикулярной к N (или N'), наблюдают широкую полосу нулевого порядка [26]. Ширину и направление полос регулируют поворотами зеркал, изменяя при этом угол между пучками a_1 и a_2 .

Для реализации ширинг-метода в интерферометр дополнительно вводят плоскопараллельные пластины и другие элементы, позволяющие преобразовать его в модифицированный интерферометр Маха-Цендера с боковым сдвигом волновых фронтов (более подробно это рассматривается в следующем разделе).

7.2.2. Интерферометр сдвига

Основной принцип интерферометра сдвига (его еще называют ширинг-интерферометром или ширинг-методом) заключается в небольшом смещении деформированного фронта волны и получении интерференционной картины между ним и исходным волновым фронтом. Если волновой фронт близок к плоскому, то боковой сдвиг достигается его смещением, как представлено на рис. 7.3. [27].

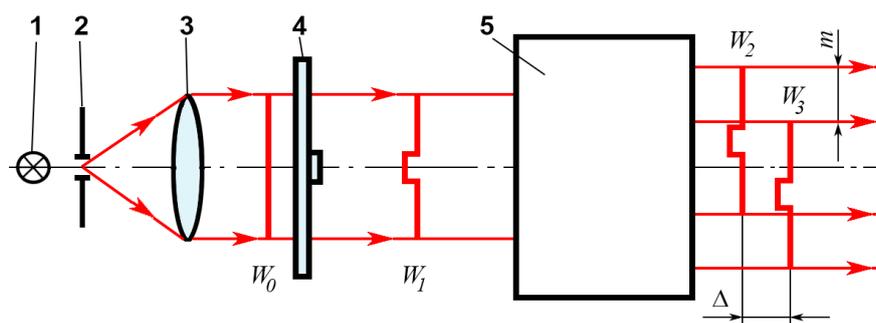


Рис. 7.3. Интерферометр бокового сдвига.

1 – источник света; 2 – щель; 3 – линза; 4 – препарат с объектом прямоугольной формы; 5 – интерферометр; m – величина бокового сдвига; Δ – разность хода между волновыми фронтами W_2 и W_3 .

Плоский волновой фронт W_0 проходит через препарат 4 с объектом прямоугольной формы. Деформированный объектом волновой фронт W_1 входит в интерферометр 5. В интерферометре он разделяется на два

фронта W_2 и W_3 с разностью хода Δ и сдвигаются друг относительно друга на расстояние m .

«Ямка» волны W_2 накладывается на недеформированный участок волны W_3 , а «ямка» волны W_3 – на плоский участок волны W_2 . В результате на интерференционной картине наблюдают две «ямки», т.е. два интерференционные изображения объекта. [26, 27].

7.2.3. Интерферометр Майкельсона

Оптическая схема интерферометра Майкельсона представлена на рис. 7.4. Коллектор 2 проецирует источник 1 в плоскость диафрагмы 3, расположенной в фокальной плоскости объектива 4 (3 и 4 представляют собой коллиматор). Параллельный пучок лучей частично отражается от полупрозрачной поверхности AA пластины 8, а частично проходит через нее. Пучки лучей, отраженные от зеркал 6 и 7, вновь соединяются и интерферируют. Интерференционную картину наблюдают с помощью зрительной трубы 10-11 [26]. При юстировке прибора компенсационная пластина 5 служит для выравнивания толщин стекол в двух ветвях интерферометра.

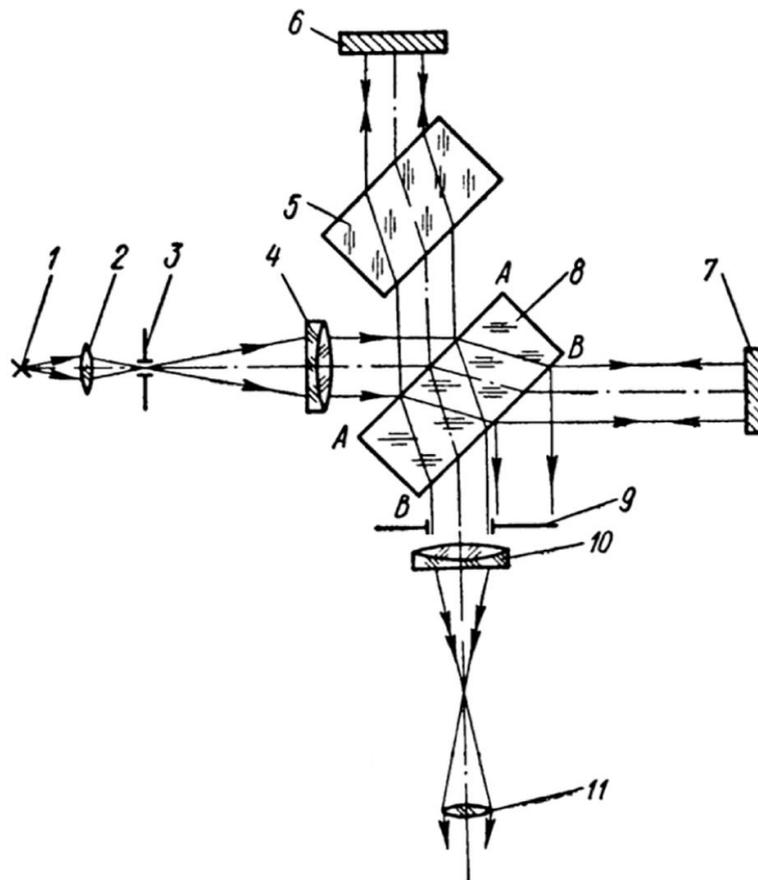


Рис. 7.4. Оптическая схема интерферометра Майкельсона.

1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – диафрагма; 4 – объектив; 5 – компенсационная пластина; 6 и 7 – зеркала; 8 – пластинка с полупрозрачной поверхностью AA ; 9 – диафрагма; 10 – объектив; 11 – окуляр.

7.3. Интерференционный микроскоп отраженного света. Микроинтерферометр Линника

Микроинтерферометр Линника представляет собой сочетание интерферометра Майкельсона с микроскопом отраженного света.

Оптическая схема микроинтерферометра (рис. 7.5.) состоит из трех частей: осветительной, наблюдательной и канала сравнения. Осветительная и наблюдательная части схемы представляют собой микроскоп отраженного света. Осветительная система содержит: источник света 1, коллектор 2, апертурную диафрагму 4, полевую диафрагму 5 и наклонную светоделительную пластину 9. Наблюдательная часть состоит из микрообъектива 7 и окуляра 14 – 15. Освещение настраивают по методу Кёлера. Коллектор 2 проектирует нить лампы накаливания 1 в плоскость апертурной диафрагмы 4, а изображение этой диафрагмы проектируется линзой 6 в зрачок микрообъектива 7. Полевая диафрагма 5 расположена в фокальной плоскости объектива 6, который совместно с микрообъективом 7 формирует ее изображение в плоскости исследуемого объекта 8.

Пластина 9 с полупрозрачным покрытием разделяет падающие на нее параллельные лучи и направляет их в две ветви интерферометра: один пучок – в микрообъектив 7 и объект 8, а второй – в микрообъектив 11, в фокальной плоскости которого установлено зеркало 12 для формирования волны сравнения. После отражения от поверхностей 8 и 12 оба пучка соединяются пластиной 9. Правильная настройка прибора обеспечивает наблюдение в поле зрения окуляра 14 – 15 системы интерференционных полос.

Два микрообъектива 7 и 11, установленные в двух ветвях интерферометра, должны быть идентичными, высокого качества и обладать тубусом «бесконечность». Компенсатор 10 введен в канал сравнения для выравнивания длины хода лучей в стеклах. Его положение относительно оптической схемы устанавливают при юстировке прибора. Компенсатор 10 и пластина 9 имеют одинаковую толщину и изготовлены из одного сорта стекла (на практике их вырезают из единой пластины).

После выравнивания каналов и центрирования микрообъективов, а также при установке объекта 8 и зеркала 12 перпендикулярно оптической оси прибора, в плоскости полевой диафрагмы 14 получают интерференционную картину в виде широкой полосы нулевого порядка. В результате через окуляр наблюдают изображения двух поверхностей: объекта 8 и зеркала 12. Высокое качество поверхности зеркала 12 позволяет видеть только изображение объекта. Два сменных светофильтра 3 позволяют работать в монохроматическом свете.

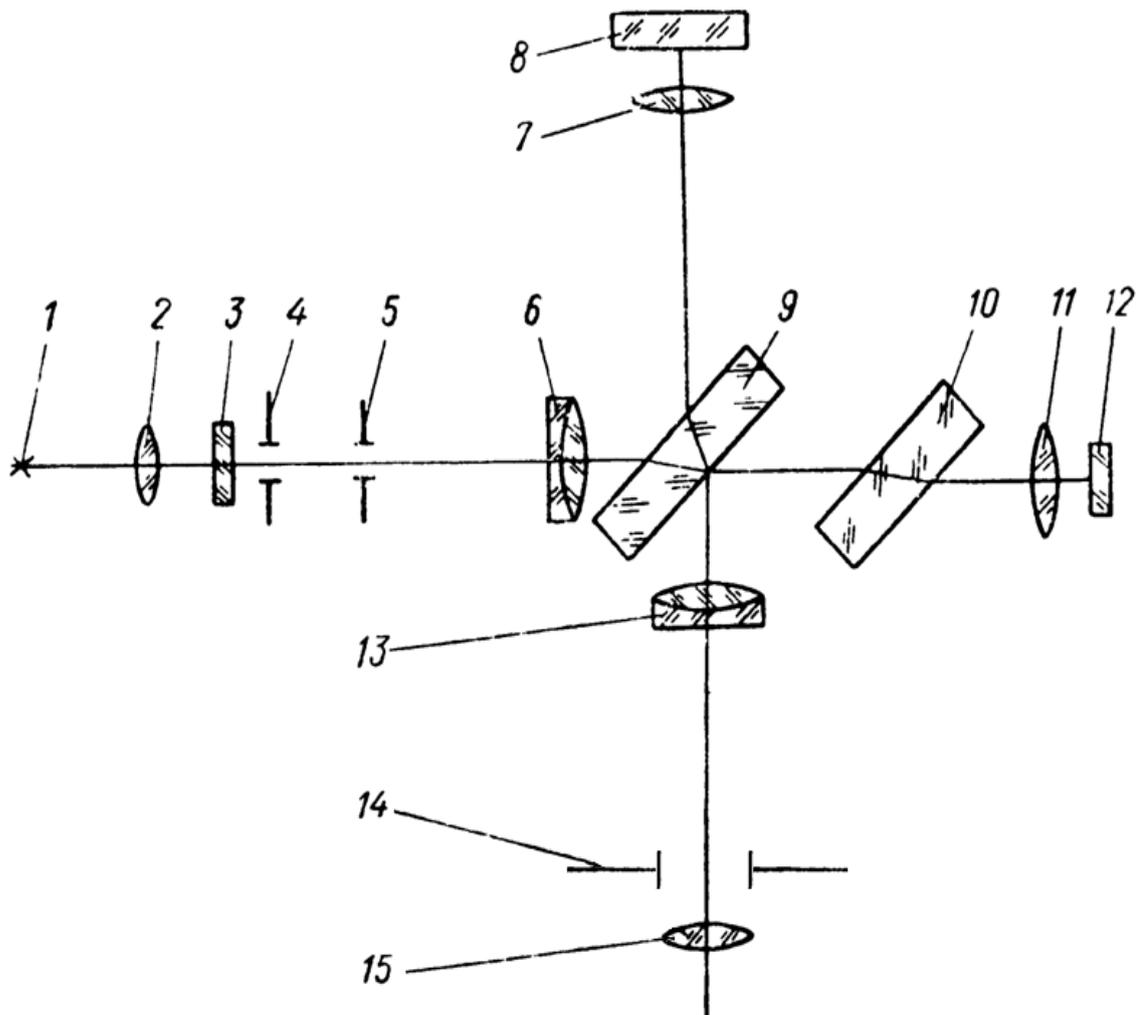


Рис. 7.5. Микроинтерферометр Линника МИИ-4.

1 - источник света; 2 - коллектор; 3 - светофильтр; 4 - апертурная диафрагма; 5 - полевая диафрагма; 6 - объектив; 7 и 11 - микрообъективы ($F = 6,16 \text{ мм}$, $A = 0,65$); 8 - исследуемый объект; 9 - светоделительная пластина; 10 - компенсационная пластина; 12 - зеркало; 13 - объектив (тубусная линза); 14 - полевая диафрагма; 15 - линза окуляра.

Интерференционные полосы в поле зрения окуляра можно получить двумя способами:

- наклоном зеркала 12 или объекта 8 на некоторый малый угол β (при $\beta = 15 \cdot 10^{-3}$ радиан в поле зрения получают 15 полос);
- смещением оси микрообъектива 11 относительно оптической оси канала сравнения на малый отрезок a .

В микроинтерферометре МИИ-4 реализуется второй способ получения полос. На рис. 7.6. изображены канал наблюдения и канал сравнения.

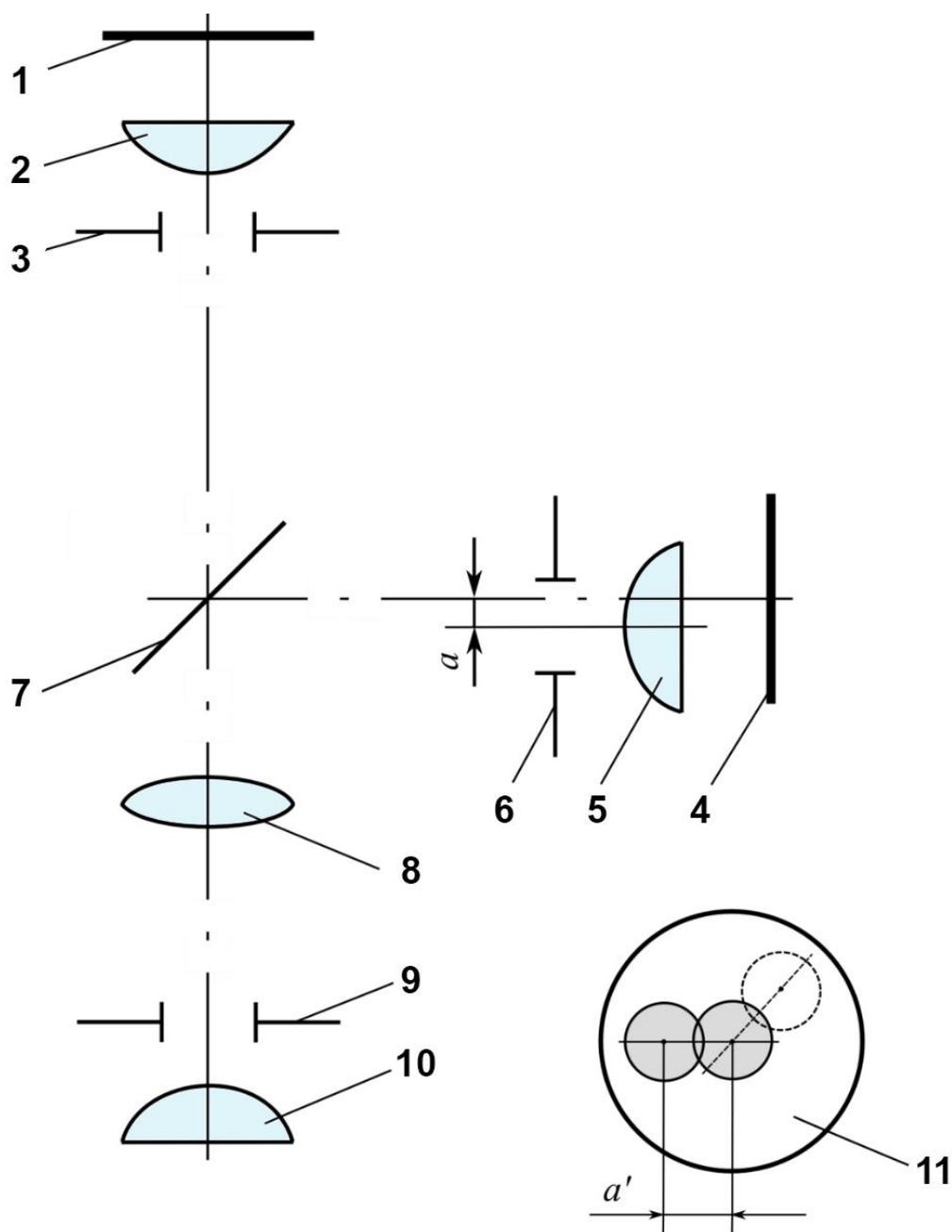


Рис. 7.6. Схема смещения микрообъектива в канале сравнения микроинтерферометра МИИ-4.

1 – объект; 2-3 – микрообъектив (3 – апертурная диафрагма); 4 – зеркало; 5-6 – микрообъектив канала сравнения (6 – апертурная диафрагма); 7 – светоделительная пластина; 8 – линза; 9-10 – окуляр (9 – полевая диафрагма); 11 – вид поля зрения вспомогательного микроскопа.

Зрачки 3 и 6 микрообъективов выполняют роль когерентных источников света S_1 и S_2 (см. рис. 7.4.). Для получения полос объектив 5 - 6 смещают на расстояние a , как показано на рис. 7.6. Конструкция МИИ - 4 обеспечивает возможность изменения расстояния a и вращения объектива 5-6 вокруг первоначальной оси прибора. Если $a = 0$, то в поле зрения 9 окуляра 9-10 наблюдают широкую нулевую полосу. На рисунке

представлено поле зрения 11, наблюдаемое с помощью вспомогательного микроскопа (или при вынутом окуляре 9-10). В центре этого поля расположено изображение зрачка 3, а на расстоянии a' – изображение зрачка 6. От расстояния a' зависит количество полос, а от угла поворота зрачка 6 – направление полос (полосы направлены перпендикулярно линии, соединяющей центры зрачков).

На рис. 7.7. представлен внешний вид микроинтерферометра Линника МИИ-4М.



Рис. 7.7. Внешний вид микроинтерферометра Линника МИИ-4М, фирма ЛОМО [28].

Исследуемый объект кладут контролируемой поверхностью вниз на предметный столик. Видимое увеличение микроскопа равно 500 крат, а диаметр поля зрения в плоскости объекта составляет 0,3 мм.

7.4. Интерференционный микроскоп проходящего света

Интерференционный микроскоп проходящего света применяют в биологии, медицине, минералогии, при исследованиях тонких пленок, волокон и т.п. Микроскоп создан на базе поляризационного микроскопа. В рассматриваемой модели используют поляризационную двоякопреломляющую призму для получения двух когерентных пучков,

а для получения интерференционной картины – ширинг-метод, т.е. метод бокового сдвига обыкновенной и необыкновенной волн [29].

На рис. 7.8. представлены два варианта сдвига плоских волн относительно друг друга: обыкновенной W_o и необыкновенной W_e . Если величина раздвоения m больше размера объекта k , тогда такое раздвоение называют *полным* (рис. 7.8.а.). Если $m < k$, тогда раздвоение называют *дифференциальным* (рис. 7.8.б.) [30].

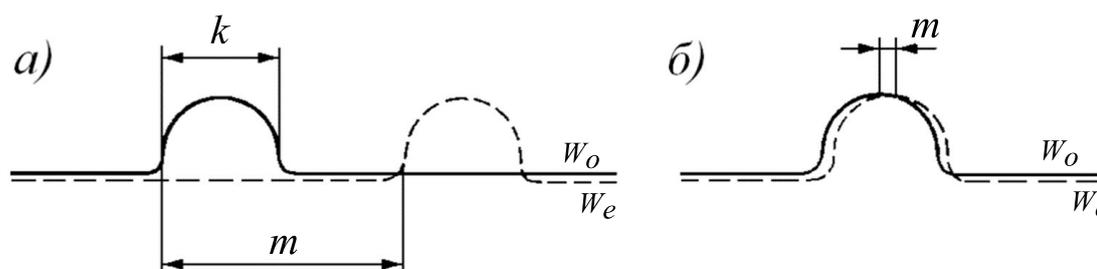


Рис.7.8. Два варианта раздвоения изображения объекта, полученное при смещении обыкновенной W_o и необыкновенной W_e волн.

а) полное раздвоение; б) дифференциальное раздвоение.

Микроскоп позволяет производить качественные и количественные исследования. К основным методам исследования относятся метод полос и метод однородного поля (или метод однородного цвета) с полным или дифференциальным раздвоениями изображений.

Настройка и ориентация поляризационных компонентов интерференционного микроскопа является необходимым условием для получения точных измерений, следовательно, подготовка микроскопа должна выполняться тщательно и без упрощений.

7.4.1. Оптическая схема микроскопа

Принципиальная схема интерференционного микроскопа представлена на рис. 7.9. Коллектор 2-3 проектирует изображение источника света 1 в плоскость апертурной диафрагмы 5 конденсора 5-6. Объектив 8-9 создает увеличенное изображение объекта прямоугольной формы на препарате 7 в плоскости полевой диафрагмы 12 окуляра 12-13.

К основным элементам интерферометра относятся: поляризатор 4, щелевая диафрагма 5, призма 10 и анализатор 11. Щелевая диафрагма расположена в апертурной диафрагме конденсора.

Призма 10 представляет собой модифицированную двулучепреломляющую поляризационную призму Волластона (или призму Номарского) с вынесенной плоскостью локализации интерференционных полос. Она помещена за объективом 8-9 и может перемещаться как в параллельном, так и перпендикулярном направлениях относительно оси микроскопа. Слева на рисунке в

увеличенном масштабе показаны эта призма (см. 14) и расположение плоскости локализации интерференционных полос. Действие призмы заключается в разделении линейно поляризованного пучка лучей на два пучка: обыкновенный и необыкновенный.

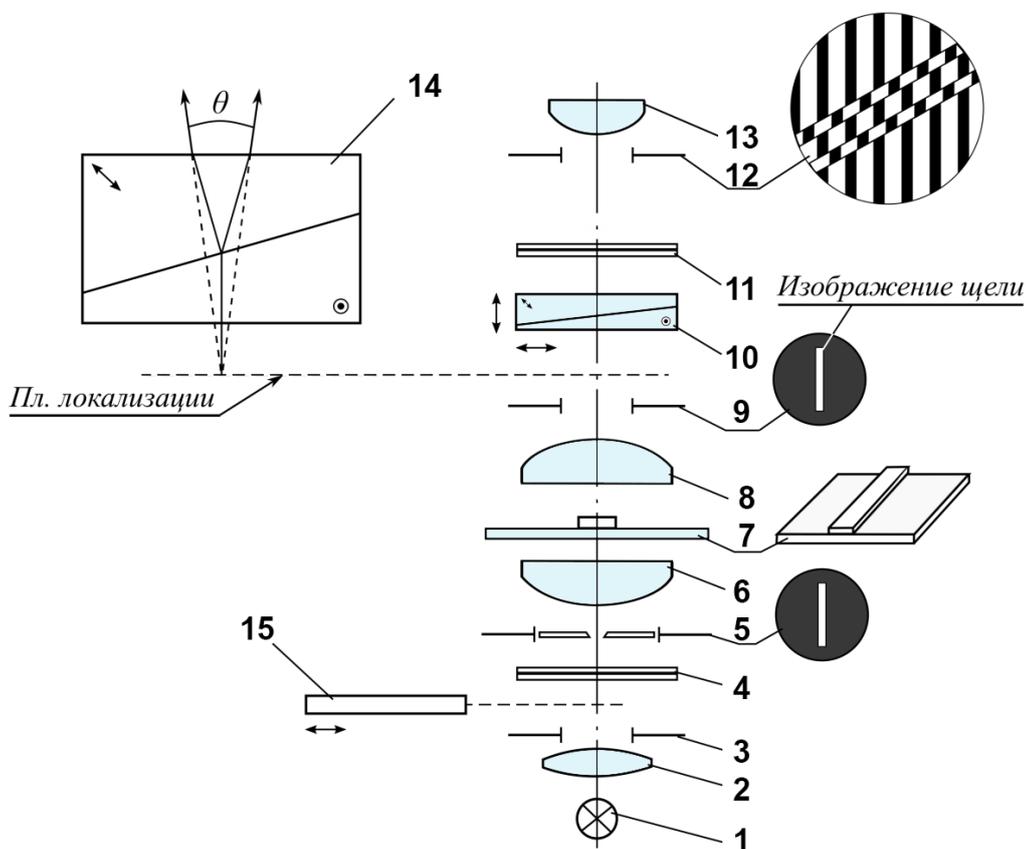


Рис. 7.9. Оптическая схема интерференционно микроскопа.

1 - источник света; 2-3 – коллектор (3 – полевая диафрагма); 4 – поляризатор; 5-6 – конденсор (5 - щелевая диафрагма); 7 – объект; 8-9 – объектив (9 – апертурная диафрагма); 10 - двоякопреломляющая призма; 11 – анализатор; 12-13 – окуляр (12 – полевая диафрагма); 14 - двоякопреломляющая призма; 15 – светофильтр.

Поляризатор 4, анализатор 11 и расположенная между ними призма 10 создают в плоскости локализации систему прямолинейных интерференционных полос (см. рис. 5.11.а. и б.). Контраст полос зависит от взаимной ориентации этих элементов. Максимальный контраст полос соответствует такому положению призмы, при котором ее преломляющая грань составляет угол 45° с направлением пропускания поляризатора, а анализатор при этом либо параллелен, либо скрещен с поляризатором. В плоскости локализации ширина полосы h зависит только от параметров призмы. Для данной призмы эта ширина имеет постоянное значение, равное $h = \lambda/\theta$, где λ – длина волны; θ – угол между обыкновенным и необыкновенным лучами.

Щель 5 вместе с линзой 6 представляют собой коллиматор, из которого выходят параллельные когерентные пучки лучей. Изображение щели направляют параллельно преломляющей грани призмы, т.е. вдоль полос в плоскости локализации.

Пусть на предметном стекле препарата 7 расположен исследуемый фазовый объект в виде узкой полоски, а его показатель преломления больше показателя преломления среды ($n_{об} > n_{ср}$). Объект деформирует плоскую линейно поляризованную волну, вышедшую из конденсора. После объекта деформированная волна попадает в объектив 8-9, а затем раздваивается призмой 10 на две деформированные, взаимно перпендикулярные волны: обыкновенную и необыкновенную. Из этих волн анализатор 11 пропускает только те составляющие, которые параллельны его собственному пропусканию. Следовательно, анализатор 11 пропускает две линейно поляризованные компоненты обыкновенной и необыкновенной волн, которые могут интерферировать.

Интерференционный светофильтр 15 служит для исследований в монохроматическом свете. Обычно в комплект микроскопа входят два интерференционных светофильтра: зеленый и желтый.

В зависимости от положения призмы 10 относительно выходного зрачка 9 в плоскости изображения 12 получают интерференционную картину одного из двух видов:

- 1) *сдвоенное изображение объекта на фоне прямых интерференционных полос*, полученное так называемым методом интерференционных полос (как показано на рис. 7.9.);
- 2) *сдвоенное изображение объекта на однородном фоне*, полученное методом однородного поля (как показано на рис. 7.12.).

Измерение разности хода осуществляют либо при *полном раздвоении* изображений, либо при *дифференциальном*, получить которые возможно только с разными двоякопреломляющими призмами. Эти призмы отличаются углами раздвоения θ . В обоих случаях применяют щель 5. Существуют методы измерений частично перекрывающихся изображений, которые мы здесь рассматривать не будем.

7.4.2. Метод интерференционных полос

Вид интерференционной картины в поле зрения 12 зависит от положения призмы 10 и ширины щели. Для получения полос плоскость локализации призмы *не должна совпадать* с плоскостью выходного зрачка 9. Это означает, что призму 10 необходимо переместить вверх вдоль оптической оси, как показано на рис. 7.9. При этом щель конденсора должна быть достаточно узкой.

В этом случае призма изменяет ход лучей в пространстве изображений, что приводит к наклону волновых фронтов W_o и W_e . Угол

наклона между фронтами становится тем больше, чем выше поднята призма. Полосы в поле зрения представляют собой полосы равной толщины.

Порядок настройки микроскопа. Сначала освещение в микроскопе настраивают по методу Кёлера при широко раскрытой щели. Установленный на столике препарат смещают относительно объектива 8-9 на такое расстояние от исследуемого объекта, на котором отсутствуют оптические неоднородности. После соответствующей ориентации анализатора и поляризатора необходимо значительно сузить щель и установить ее изображение в центре выходного зрачка 9. Изображение щели наблюдают с помощью вспомогательного микроскопа.

В белом свете исследователь видит через окуляр прямые цветные интерференционные полосы. Затем, регулируя ширину щели, добивается максимально четких и контрастных интерференционных полос. В центре находится нулевая полоса: темная при скрещенных поляризаторе и анализаторе и белая (ахроматическая) – при параллельных, причем по мере возрастания порядка интерференции полосы становятся менее интенсивными и, в конце концов, размываются. После выполнения этих операций, микроскоп настроен для работы по методу интерференционных полос.

Перемещая препарат с помощью препаратоводителя, объект устанавливают в центре поля зрения. Вращая столик, объект удлиненной формы (например, полоску или волокно) рекомендуют устанавливать под углом 45° к направлению полос. На рис. 7.10. представлены изображения объектов, полученные методом интерференционных полос при полном (*а* и *б*) и дифференциальном (*в*) раздвоении изображения.

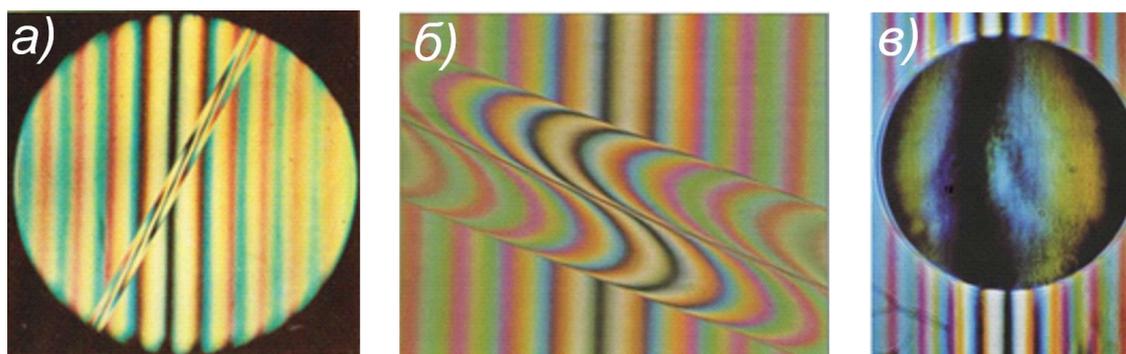


Рис. 7.10. Изображения, полученные методом интерференционных полос в белом свете.

а) волокно канадского бальзама в кедровом масле, объектив $10\times$ (полное раздвоение) [29]; *б)* стекловолокно, объектив $12,5\times 0,25$ (полное раздвоение) [31]; *в)* стеклянный шарик, объектив $50\times 0,80$ (дифференциальное раздвоение) [31].

Стоит подчеркнуть, что, передвигая призму вдоль оси микроскопа, можно, до некоторой степени, сужать и расширять интерференционные

полосы в поле зрения 12 (рис. 7.9.). Причем в верхнем положении призмы получают полосы более узкие, а в нижнем – более широкие. Иными словами, приближая призму из верхнего положения вниз к объективу 8-9, в плоскости изображения 12 полосы сначала становятся более широкими, а затем переходят в однородное поле, когда плоскость локализации призмы точно совпадет с плоскостью выходного зрачка 9.

В поле зрения 12 получают два изображения одного и того же объекта на некотором расстоянии друг от друга, причем отклонение интерференционных полос в этих изображениях направлено в противоположные стороны (см. рис. 7.10.б.). В белом свете легче всего определять положение темной нулевой полосы при первой окрашенной полосы.

Измерение оптической разности хода в самом простом случае заключается в определении ширины полосы h' в поле зрения 12 и величины смещения d интерференционных полос в изображении исследуемого объекта (рис. 7.11.). В случаях измерения оптической разности хода узких полосок, уступов или бороздок их также устанавливают наклонно по отношению к направлению интерференционных полос.

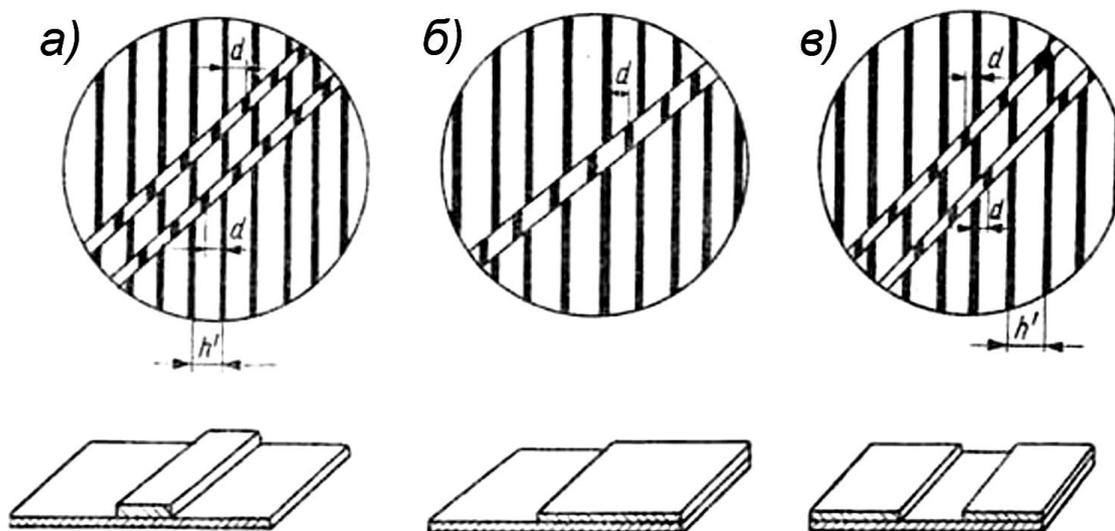


Рис. 7.11. Интерференционные картины на фоне полос для трех видов объекта вытянутой формы [29].

а) изображение порога; б) изображение ступеньки; в) изображение борозды.

Метод интерференционных полос позволяет измерять оптическую разность хода с точностью $\lambda/10 - \lambda/20$.

7.4.3. Метод однородного поля

Подготовку микроскопа для работы по методу однородного поля также начинают с настройки освещения по Кёлеру при широко открытой щели конденсора 5-6 (рис. 7.12.).

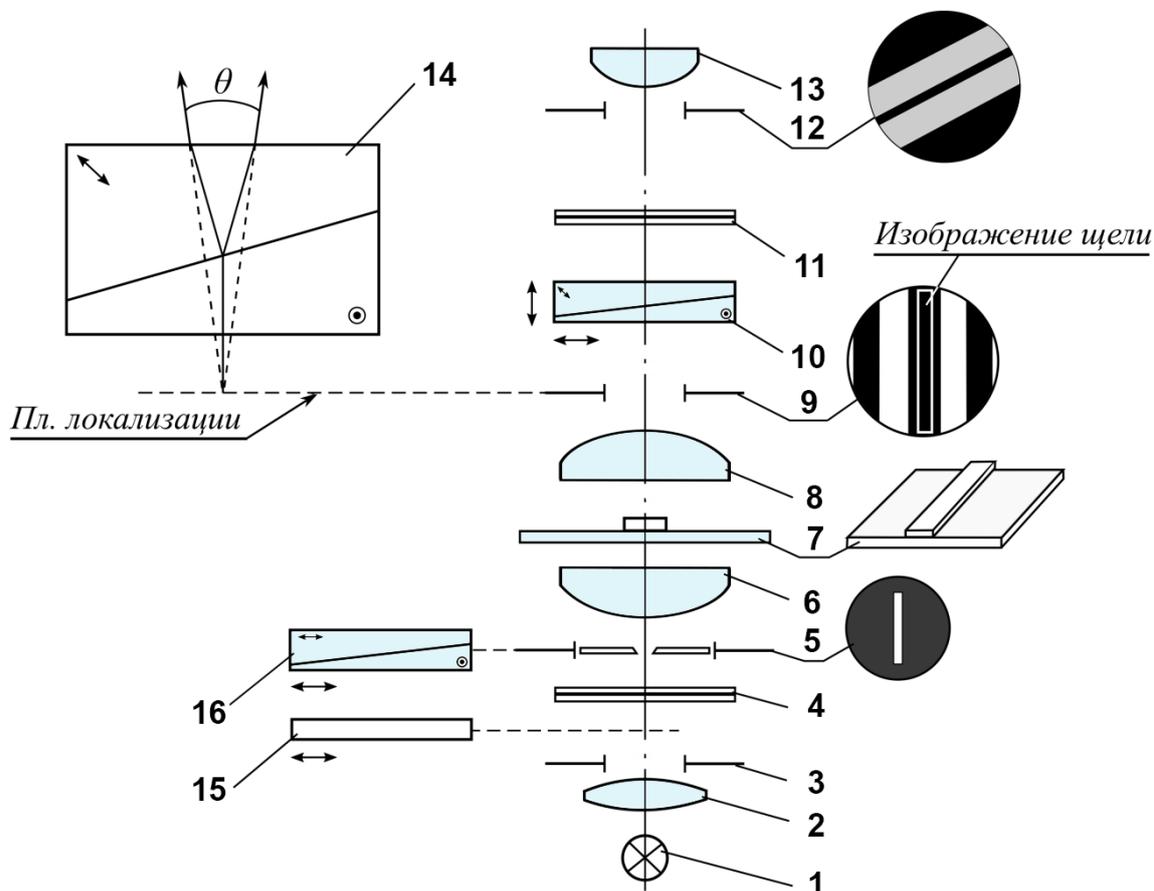


Рис. 7.12. Оптическая схема интерференционного микроскопа.

1 - источник света; 2-3 – коллектор (3 – полевая диафрагма); 4 – поляризатор; 5-6 – конденсор (5 – щелевая диафрагма); 7 – объект; 8-9 – объектив (9 – апертурная диафрагма); 10 – двоякопреломляющая призма; 11 – анализатор; 12-13 – окуляр (12 – полевая диафрагма); 14 - двоякопреломляющая призма; 15 – светофильтр; 16 – призма Волластона.

Настройку осуществляют с источником белого света (например, с лампой накаливания). Затем призму 10 приближают к объективу 8-9 до точного совмещения плоскости локализации полос с выходным зрачком 9. Препарат 7 смещают таким образом, чтобы под объективом находилась только среда, в которую заключен объект.

Выходной зрачок объектива наблюдают с помощью вспомогательного микроскопа. Взаимная ориентация щели, интерференционных полос призмы и направлений пропускания поляризатора и анализатора представлена на рис. 7.13. Скрещенные анализатор и поляризатор устанавливают под углом 45° к направлению полос.

При правильной установке призмы в выходном зрачке 5 наблюдают широкие интерференционные полосы с темной полосой нулевого порядка в центре. Изображение щели 1 устанавливают в центре зрачка и направляют его вдоль нулевой полосы, как показано на рис. 7.13. Ширину щели выбирают такой, чтобы она «вырезала» центральную часть нулевой полосы.

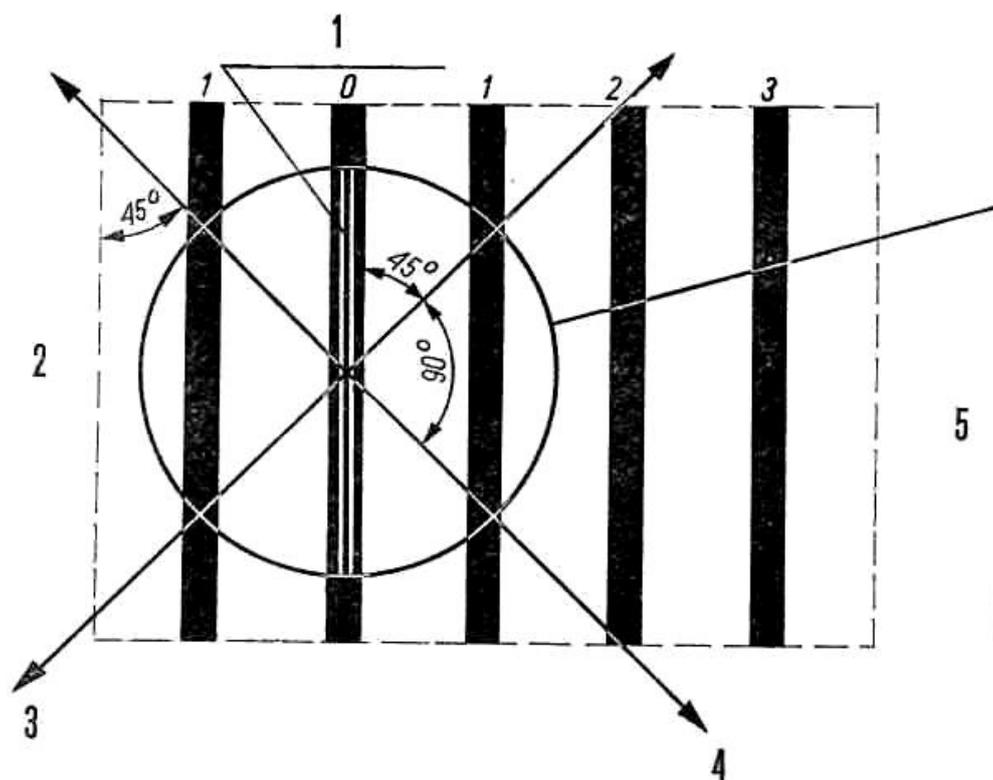


Рис. 7.13. Взаимная ориентация щели, полос и поляризатора с анализатором в плоскости выходного зрачка объектива [29].

1 – изображение щели; 2 – грань двоякопреломляющей призмы; 3 – направление пропускания анализатора; 4 – направление пропускания поляризатора; 5 – выходной зрачок объектива.

Плоскость изображения (полевая диафрагма окуляра). В плоскости изображения 12 (рис. 7.12.) деформированные объектом волновые фронты W_o и W_e являются практически параллельными, но сдвинутыми относительно друг друга, в результате этого получают два изображения объекта. Величина разности хода Δ между недеформированными участками фронтов зависит от смещения призмы 10 перпендикулярно оптической оси микроскопа.

Смещение призмы приводит к тому, что щель «вырезает» ту или иную полосу. На рис. 7.14.а. представлен вид полос в плоскости локализации, совмещенной со зрачком объектива, Цветные полосы первого и второго порядков расположены с обеих сторон от темной нулевой полосы. На рисунке обыкновенная o и необыкновенная e волны условно представлены в виде синусоид, длина которых соответствует оптической длине пути, приобретенной в призме (см. рис. 5.10.). Следует

обратить внимание на то, что разность хода Δ между фронтами W_o и W_e зависит не только от величины смещения призмы, но и от того, с какой стороны щель «вырезает» полосу, т.е. с разных сторон от нулевой полосы разность хода отличается знаками ($-\Delta$ и $+\Delta$).

Призму передвигают с помощью специального механизма перпендикулярно оптической оси микроскопа таким образом, чтобы щель «вырезала» полосу первого или второго порядка (считая от темной нулевой полосы) для получения нужного цвета.

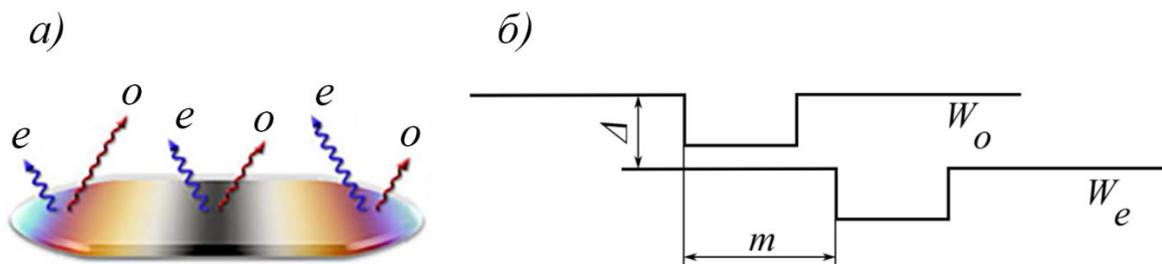


Рис. 7.14. Разность хода Δ между обыкновенным W_o и необыкновенным W_e фронтами при смещении призмы.

а) полосы в плоскости локализации призмы; б) обыкновенный W_o и необыкновенный W_e волновые фронты.

Δ – разность хода; m – величина сдвига.

На рис. 7.14.б. представлены деформированные объектом фронты W_o и W_e , интерференцию между которыми наблюдают в поле зрения, в случае, когда фронт W_o опережает фронт W_e , т.е. при смещении призмы вправо. При смещении призмы влево фронт W_e будет опережать фронт W_o .



Рис. 7.15. Изображение диатомовых водорослей «Pleurosigma angulatum» в однородном интерференционном поле, объектив $10\times$ [29].

Темный фон. Если щель установлена в центре нулевой полосы, то разность хода между W_o и W_e равна нулю ($\Delta = 0$). В результате

наблюдаемое через окуляр поле становится максимально темным. При введении объекта деформированные им участки отличаются от фона цветом (в белом свете) или яркостью (в монохроматическом свете). Причем оба изображения имеют одинаковый цвет, так как расположены симметрично относительно нулевой полосы. На рис. 7.15 представлены изображения диатомовых водорослей, полученные при $\Delta = 0$. Изображения одинаково окрашены в лавандово-серый цвет.

Цветной фон. Если щель «вырезает» часть полосы первого порядка, то фон становится окрашенным в однородный цвет. Например, при $\Delta = 0,565$ мкм фон приобретает *пурпурный цвет*, который называют *чувствительным цветом* первого интерференционного порядка. Характерная особенность этого пурпурного цвета заключается в быстром переходе в красные или фиолетовые оттенки при малом изменении разности хода, т.е. происходит заметное изменение цвета при малом изменении оптической разности хода.

Если щель точно совпадает с пурпурной частью полосы, то фон поля зрения также становится окрашенным в пурпурный цвет (рис. 7.16.а), т.е. в тот цвет, который «вырезает» щель. В случае, если в поле зрения, кроме пурпурного цвета, появляются и другие цвета (рис. 7.16.б), то это означает, что призма установлена не точно (плоскость локализации полос не совпадает с плоскостью зрачка), и ее необходимо сместить вдоль оси микроскопа до получения однородного фона.

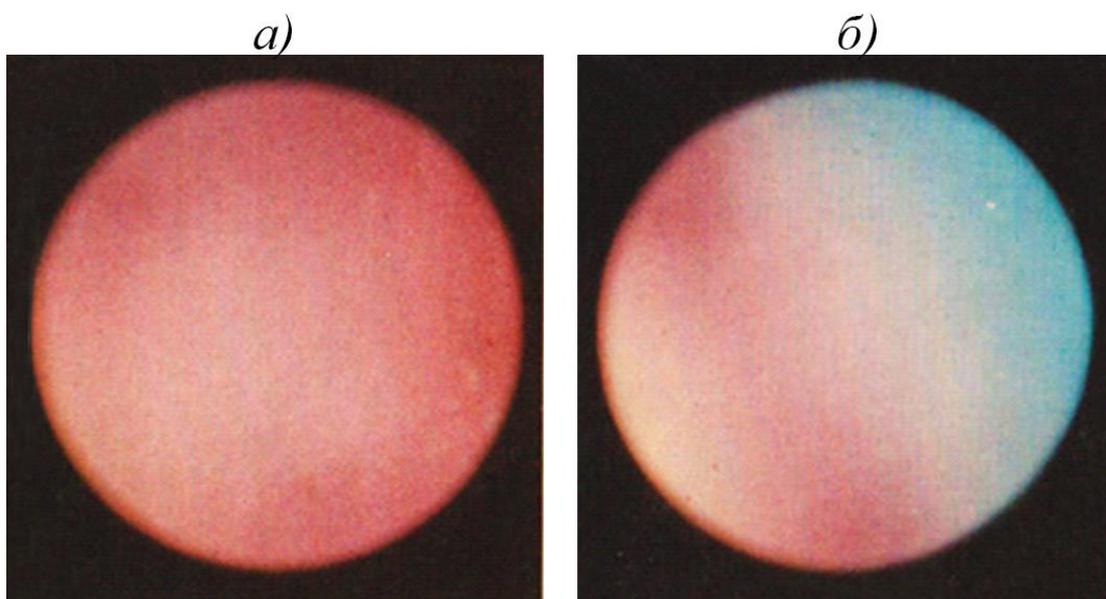


Рис. 7.16. Настройка интерференционного микроскопа на однородный чувствительный цвет первого порядка (на пурпурный цвет) [29].

а) правильная; б) неправильная.

При введении объекта не только цвет изображений будет отличаться от фона, но и каждое из двоянных изображений может

отличаться по цвету друг от друга. Наиболее наглядно эффект отличия цветов двух изображений представлен на рис.7.17., в котором раздвоенные изображения клеток эритроцитов окрашены в разные цвета.

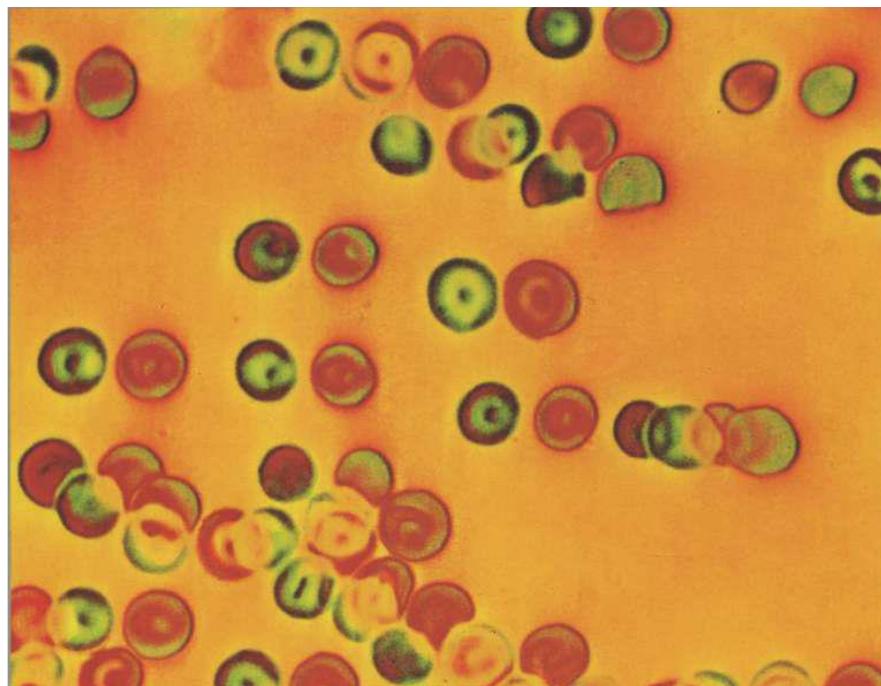


Рис. 7.17. Мазок крови. Изображение получено при полном раздвоении, объектив 25×0,50 [31].

Смещение призмы позволяет изменять условия наблюдения в цветовом интерференционном контрасте, а также определять разность хода, вносимого объектом, с помощью механизма смещения призмы и/или визуально по цветовым характеристикам (см. таблицу).

В таблице представлены интерференционные цвета в зависимости от разности хода между обыкновенной и необыкновенной волнами при скрещенных и параллельных поляризаторе и анализаторе.

Таблица. Интерференционные цвета в зависимости от разностей хода между обыкновенной и необыкновенной волнами.

№ п/п	Разность хода, <i>нм</i>	Скрещенные поляризатор и анализатор	Параллельные поляризатор и анализатор
1	00	черный	белый
2	40	металло-серый	белый
3	97	лавандово-серый	желтовато-белый
4	158	серо-синий	бледно-желтый
5	218	светло-серый	желто-коричневый
6	234	светло-зеленый	бурый
7	259	белый	светло-красный
8	267	светло-желтый	красно-карминовый

9	275	бледно-соломенный	красно-коричневый
10	281	желто-соломенный	темно-фиолетовый
11	306	светло-желтый	индиго
12	332	желтый	голубой
13	430	желто-коричневый	серо-голубой
14	505	темно-красный	голубовато-зеленый
15	536	красный	бледно-зеленый
16	551	темно-красный	желтовато-зеленый
17	565	пурпурный	светло-зеленый
18	575	фиолетовый	зеленовато-желтый
19	589	индиго	золотисто-желтый
20	664	голубой (как небо)	оранжевый
21	728	голубой	коричнево-оранжевый
22	747	зеленый	красно-карминовый
23	826	светло-зеленый	светло-пурпурный
24	843	желтовато-зеленый	фиолетово-пурпурный
25	866	зеленовато-желтый	фиолетовый
26	910	желтый	индиго
27	948	оранжевый	темно-голубой
28	998	оранжево-красный	зеленовато-голубой
29	1101	красный темный	зеленый
30	1128	фиолетово-голубой	желтовато-зеленый
31	1151	индиго	желто-коричневый
32	1258	голубой с зеленоватым оттенком	телесный
33	1334	зеленый морской	коричнево-красный
34	1376	ярко-зеленый	фиолетовый

Следовательно, устанавливая призму на разные цвета фона и оценивая изменение цвета в раздвоенных изображениях исследуемого объекта, определяют оптическую разность хода этого объекта по отношению к окружающей среде.

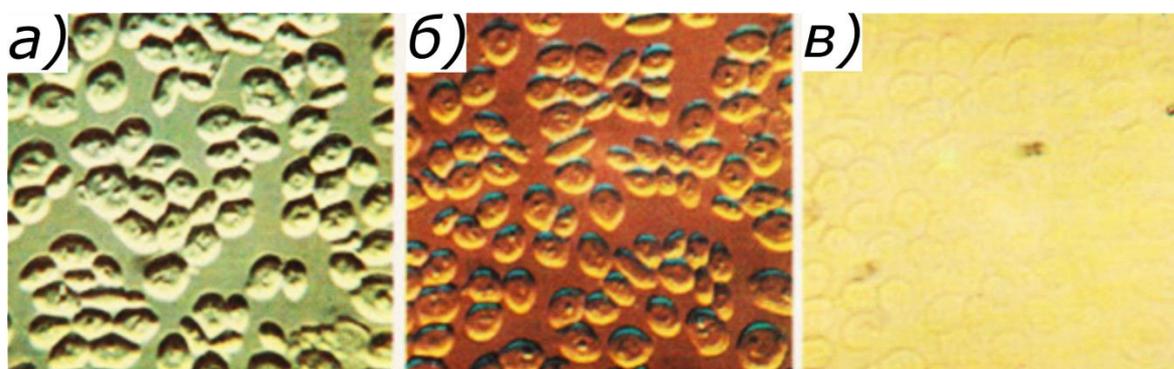


Рис. 7.18. Изображение клеток дрожжей в водной среде, объектив 100×.
a) в однородном серо-зеленом цвете; *б)* в однородном чувствительном цвете первого порядка (пурпурный фон); *в)* в традиционном светлом поле [29].

Определение разности хода по цвету во многих случаях дает хорошие результаты, однако, в большой степени является субъективным. Более объективный метод измерения состоит в том, чтобы довести окраску обыкновенного или необыкновенного изображения до выходной окраски фона и одновременно измерять поперечное передвижение призмы.

В случае исследования объектов с переменной толщиной или с переменным показателем преломления разность хода Δ в зонах раздвоенных изображений не является постоянной, а изменяется. В связи с этим будет соответственно изменяться также цвет или яркость отдельных участков изображения. По изменению цвета судят об изменении оптической разности хода

В дифференциальном интерференционном изображении исследуют градиент разности хода в направлении раздвоения, установив призму с соответствующим углом θ .

Измерение разности хода наиболее удобно производить в однородном темном поле нулевого порядка. Измерения и математический расчет позволяют определять изменение разности хода, форму объекта, показатель преломления и ряд иных величин. При благоприятных условиях наблюдения можно достичь точности измерений разности хода Δ до $\lambda/250$ [29].

7.4.4. Частный случай дифференциального метода – метод ДИК

Дифференциальный метод, в котором раздвоение изображения меньше разрешающей способности объектива, позволяет проводить качественные и количественные исследования. Полученные интерференционные изображения отличаются большой пластичностью, рельефностью, а, главное, информативностью

Однако замена щели 5 призмой Волластона 16 (при раскрытой апертурной диафрагме конденсора) и использование призмы 10 с дифференциальным двоением изображения приводит к тому, что метод становится пригодным только для качественных исследований (рис. 7.12.). Этот частный случай дифференциального метода называют методом дифференциального интерференционного контраста (ДИК) и применяют его в качестве метода контрастирования. Метод ДИК подробно рассматривается в главе 5.

7.5. Интерференционный микроскоп Peraval

На рис. 7.19. представлен внешний вид интерференционного микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss, представляющего собой сочетание микроскопа проходящего света и интерферометра Маха-Цендера.

Конструктивно интерферометр представляет собой насадку, которая крепится к штативу микроскопа.

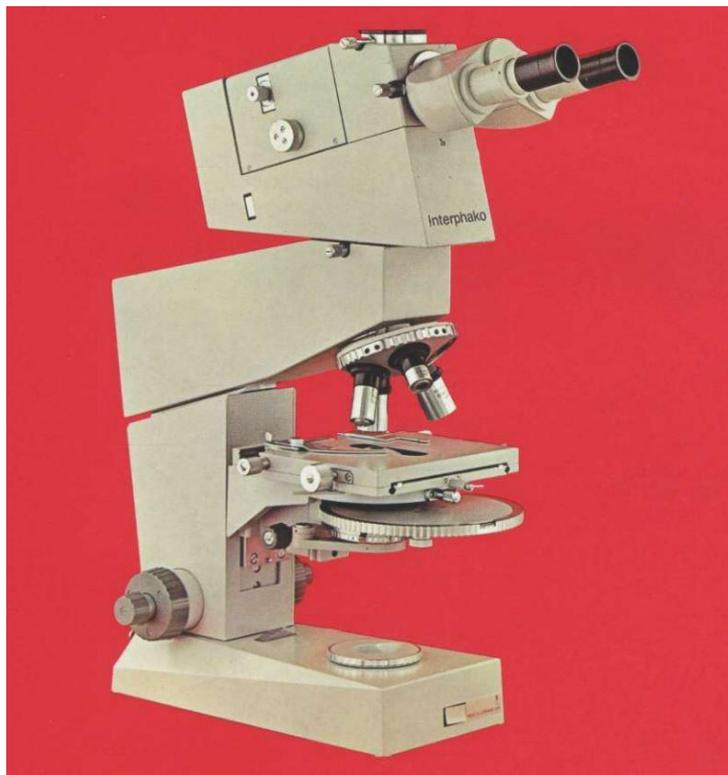


Рис. 7.19. Интерференционный микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss [31].

На рис. 7.20. представлена оптическая схема микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss.

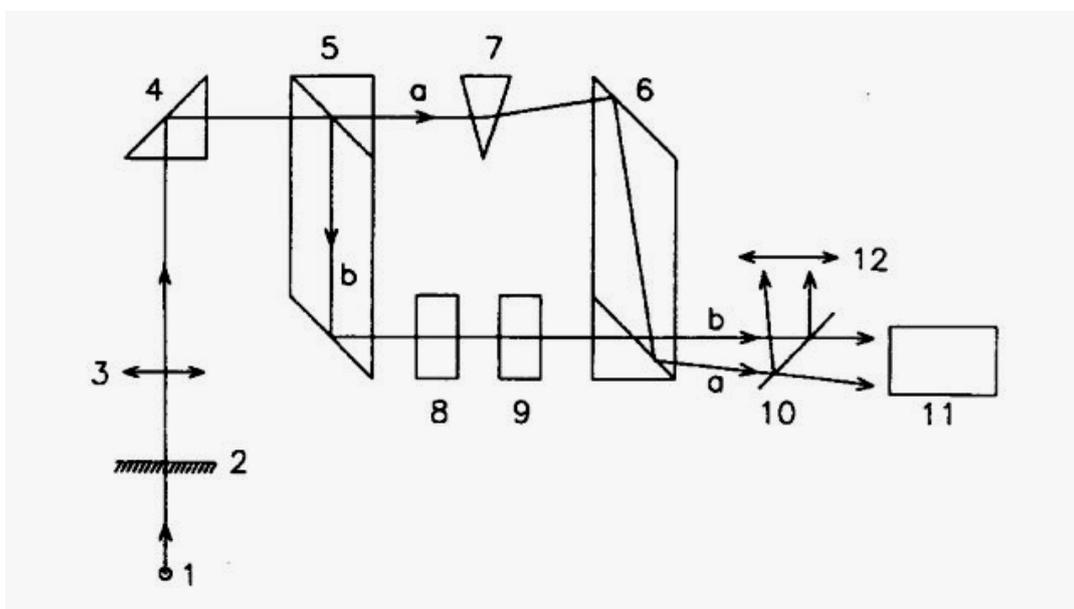


Рис. 7.20. Схема интерференционного микроскопа [31].

1 – источник света; 2 – объект; 3 – объектив; 4 – поворотная призма; 5 и 6 – призмы интерферометра; 7 – клин; 8 и 9 – компенсирующие пластинки; 10 – светоделительная пластинка; 11 – CCD камера; 12 – окуляр.

Микроскоп позволяет исследовать фазовые объекты с использованием ширинг-метода, т.е. метода сдвига волновых фронтов. Для осуществления бокового сдвига в интерферометр вводят специальные пластины. В результате насадка превращается в модифицированный интерферометр Маха-Цендера с боковым сдвигом волновых фронтов.

Заключение

Интерференционная микроскопия позволяет проводить количественные измерения с точностью от $\lambda/10$ до $\lambda/300$, благодаря применению различных схем интерферометров, например, Майкельсона, Маха-Цендера, поляризационных интерферометров и др., а также ширинг-метода (интерферометра сдвига). В приборах используются шкалы, микрометрические подвижки, узкополосные интерференционные светофильтры, щелевые диафрагмы, вспомогательный микроскоп (или линза Бертрана) и другие приспособления.

Методы интерференционной микроскопии в проходящем свете используют уникальную способность зрительного анализатора человека различать цветовые оттенки в белом свете и границы с разными освещенностями в монохроматическом свете. При благоприятных условиях методы позволяют проводить измерения с точностью до $\lambda/500$ [29]. Однако настройка микроскопа и расшифровка полученных изображений требует аккуратности и высокой квалификации исследователя. Исследователь должен понимать не только процессы, происходящие в объекте, но и в самом приборе, например, разобраться с особенностями интерференции поляризованных лучей.

В данной главе мы, конечно, не могли охватить все методы и особенности оптических схем приборов, а стремились дать общие представления и понятия, связанные с интерференционной микроскопией.

Контрольные вопросы

1. Сочетание каких двух приборов представляет собой интерференционный микроскоп? Какие параметры с помощью него можно определять?
2. Какой тип объектов исследуют на интерференционном микроскопе – изотропный или анизотропный?

Глава 8. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесцентный микроскоп предназначен для наблюдения объектов в свете их люминесценции. Однако под термином «люминесценция» понимают целый ряд различных физических явлений, связанных с *нетепловым* свечением вещества, происходящим после поглощения им энергии возбуждения [18, 32]. Какое явление исследуют с помощью люминесцентного микроскопа?

Физическая природа люминесценции состоит в излучательных переходах электронов атомов или молекул из возбуждённого состояния в основное. При люминесценции система теряет энергию, и для компенсации этих потерь необходимо подводить энергию извне. Разновидности люминесценции классифицируют по типу внешнего источника энергии и различают [32]:

- *электролюминесценцию* – например, газоразрядные лампы;
- *радиолюминесценцию* – продукты распада радиоактивных веществ;
- *хемилюминесценцию* – связана с энергией химических реакций;
- *биолюминесценцию* – свечение живых организмов;
- *термолюминесценцию* – свечение при нагревании облученного вещества;
- *триболюминесценцию* – при разрушении некоторых кристаллов;
- *сонолюминесценцию* – при воздействии звуковых волн на жидкость;
- *фотолюминесценцию* – свечение под действием света.

Из представленного перечня наиболее благоприятным для исследования под микроскопом является *фотолюминесценция*. При поглощении УФ и видимой областей спектра возбуждаются внешние электроны молекулы, т.е. именно те электроны, которые обуславливают химическую связь. Таким образом, изучение фотолюминесценции дает информацию о химическом составе и процессах, протекающих в объекте, а, кроме того, позволяет исследователю контролировать условия облучения объекта, связанные с источником возбуждающего света.

Фотолюминесценция, в свою очередь, условно подразделяется на *флуоресценцию* и *фосфоресценцию*, которые отличаются длительностью послесвечения, а именно:

- *флуоресценция* – длительность послесвечения 10^{-6} – 10^{-11} секунд с момента прекращения возбуждения;
- *фосфоресценция* – длительность послесвечения от 10^{-3} секунд до секунд, минут и даже часов после прекращения возбуждения.

Выпускаемые промышленностью традиционные люминесцентные микроскопы следовало бы называть флуоресцентными. Однако в дальнейшем мы будем придерживаться исторического названия – люминесцентный микроскоп.

Таким образом, люминесцентный микроскоп предназначен для исследования флуоресценции объектов, возникающей под действием излучения света определенного спектрального состава. Конструктивно люминесцентный микроскоп представляет собой сочетание *микроскопа с флуориметром*.

8.1. Введение во флуоресцентный анализ: основные понятия

Очень важной особенностью флуоресценции является возможность регистрации свечения при чрезвычайно малых концентрациях вещества (около 10^{-9} г/см³). Если объем кюветы составляет несколько десятых кубического сантиметра, то достаточно иметь 10^{-10} г флуоресцирующего вещества для обнаружения свечения. Эта чрезвычайная чувствительность делает возможным применение флуоресцентного анализа для решения многих практических задач [33]. Приведем основные понятия и правила.

1. *Правило Стокса или сдвиг Стокса*. Британский ученый сэра Джордж Стокс (рис. 8.1.) впервые описал флуоресценцию в 1852 году и предложил термин «флуоресценция». Стокс отметил, что флуоресцентное излучение всегда происходило на большей длине волны по сравнению с возбуждающим светом.



Рис. 8.1. Джордж Габриэль Стокс (George Gabriel Stokes), 1819 – 1903. [3]

Согласно этому правилу свет флуоресценции характеризуется *большой длиной волны*, чем поглощенный объектом свет, вызывающий флуоресценцию. Обычно расположение спектральных полос флуоресценции и поглощения соответствует изображенному на рис. 8.2., из которого видно, что полосы эти частично перекрываются. Таким образом, правило Стокса означает, что максимум полосы поглощения смещен в сторону коротких волн относительно максимума полосы флуоресценции [33]. Пользуясь правилом Стокса, подбирают светофильтры для выделения возбуждающего и света флуоресценции,

согласно методу скрещенных фильтров (случаи нарушения правила Стокса здесь рассматриваться не будут).

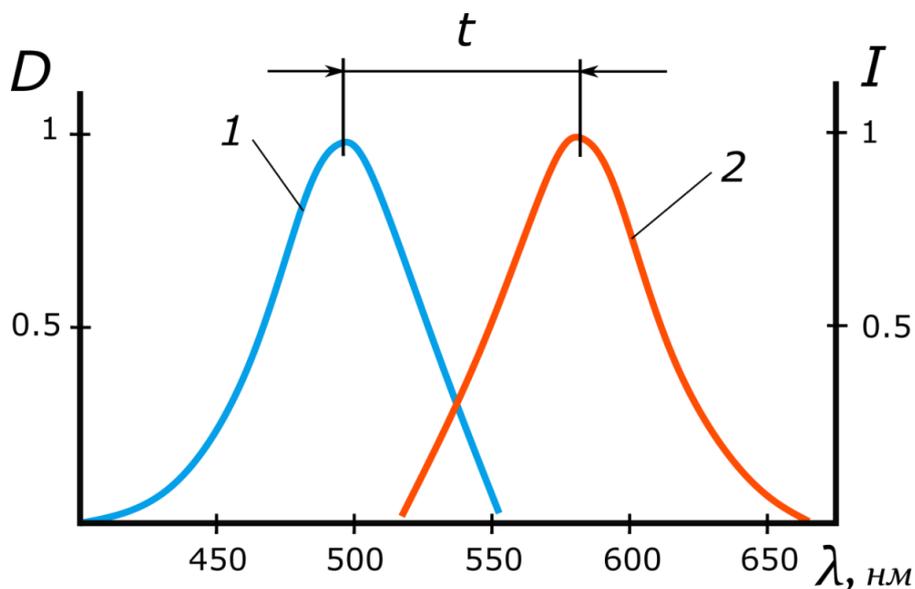


Рис. 8.2. Схема, поясняющая правило Стокса.

1 – спектр поглощения; 2 – спектр флуоресценции; t – расстояние между максимумами полос поглощения и флуоресценции; λ – длина волны.

2. *Правило зеркальной симметрии.* Для некоторых классов органических молекул правило Стокса может быть заменено, как установил В.Л. Лёвшин (рис. 8.3.), количественным соотношением, получившим название *правила зеркальной симметрии* спектров поглощения и флуоресценции. [33].



Рис. 8.3. Вадим Леонидович Лёвшин (1896 - 1969), физик, профессор МГУ [4].

Согласно наблюдениям Лёвшина, кривые поглощения и флуоресценции для этого типа веществ оказываются зеркально симметричными относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси длин волн через точку пересечения кривых, изображающих оба

спектра. Хотя правило зеркальной симметрии соблюдается не во всех случаях, однако для обширного класса сложных молекул оно позволяет делать важные заключения о структуре энергетических уровней молекулы. Это дает возможность вместо монохроматоров использовать наборы светофильтров (стеклянных или интерференционных).

В пределах полосы абсорбции можно довольно значительно изменять длину волны возбуждающего света. Исследования показывают, что спектр флуоресценции не меняется при изменении длины волны возбуждающего света, пока она находится в пределах данной полосы поглощения (рис. 8.4.). Если вещество имеет несколько полос поглощения, то возбуждение светом, относящимся к разным полосам поглощения, может вызвать изменение спектра флуоресценции, хотя нередко последний сохраняется и в данном случае [33].

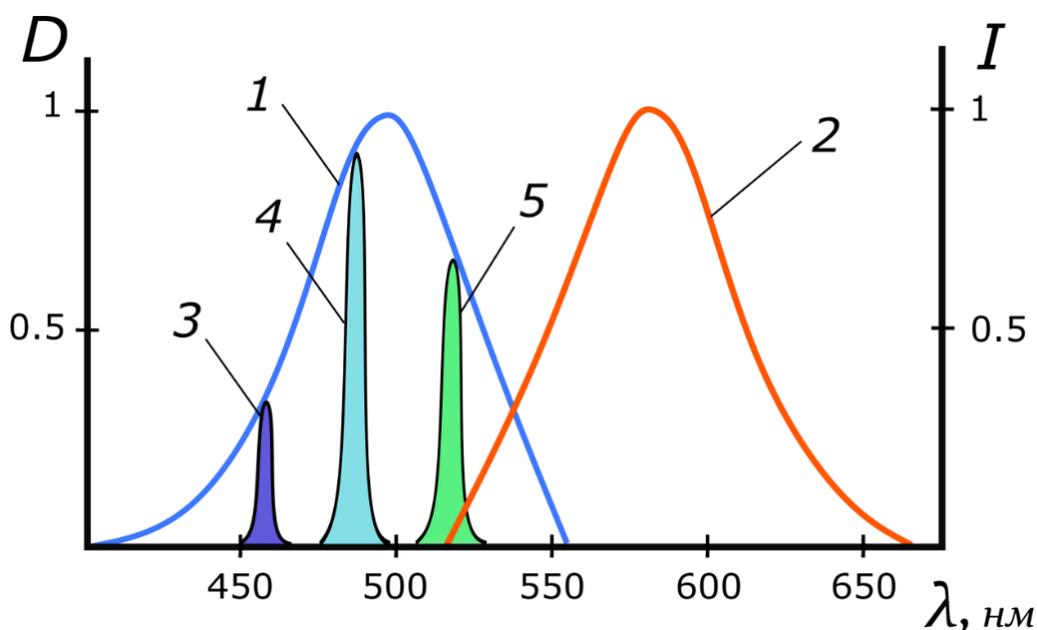


Рис. 8.4. Возбуждение флуоресценции с помощью фильтров, пропускание которых находится в пределах полосы поглощения 1, а спектр флуоресценции 2 остается неизменным [33].

1 — спектр поглощения; 2 — спектр флуоресценции; 3, 4, 5 — спектры пропускания возбуждающих светофильтров.

3. Квантовый выход флуоресценции. Не вся поглощенная энергия излучается в виде энергии флуоресценции. Квантовым выходом или коэффициентом полезного действия флуоресценции принято называть отношение числа испущенных квантов к числу поглощенных. Вавиловым было показано, что квантовый выход в растворах не зависит от длины волны возбуждающего света. Это связано с огромной скоростью колебательной релаксации, в ходе которой возбужденная молекула передает избыток энергии молекулам растворителя [4, 33].

8.2. Спектрофлуориметр и флуориметр

Спектрофлуориметр и флуориметр представляют собой приборы, предназначенные для исследования интенсивности флуоресценции, а также спектров флуоресценции, спектров возбуждения флуоресценции, квантового выхода, поляризации флуоресценции, времени жизни флуоресценции и т.п. Эти исследования сводятся к спектральным, фотометрическим, спектрофотометрическим и поляризационным методам. Высокие требования к аппаратуре связаны с тем, что флуоресценция, как правило, по своей интенсивности очень мала. Она на 3 – 6 порядков меньше интенсивности возбуждающего света. Из-за этого ее регистрация должна проходить в оптимальных условиях.

Схемы флуоресцентных приборов зависят от следующих условий:

- геометрического расположения исследуемого образца относительно возбуждающего света и сбора света флуоресценции;
- параметров источника света и приемника излучения;
- спектральных характеристик монохроматоров или светофильтров;
- затемнения помещения и т.д.

8.2.1. Схемы освещения и регистрации флуоресценции

Регистрируемая прибором интенсивность флуоресценции зависит не только от исследуемого образца, но и от его геометрического расположения.

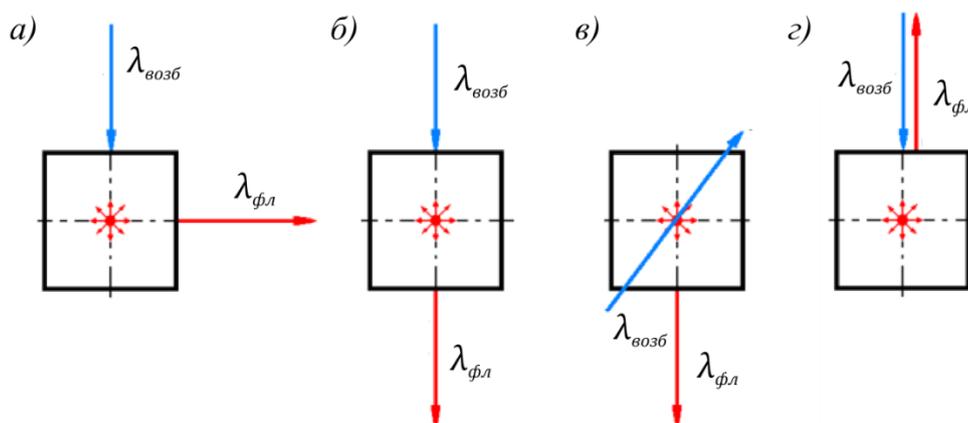


Рис. 8.5. Схемы освещения и регистрации флуоресценции объекта.

На рис. 8.5. схематически представлены возможные расположения пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции:

- возбуждающий свет проходит через образец под прямым углом к направлению регистрации;
- возбуждающий свет и регистрация флуоресценции происходят в одном направлении;

- в) освещение направлено под острым углом к направлению регистрации флуоресценции;
- г) освещение объекта и регистрация флуоресценции происходят в противоположных направлениях.

Во флуориметре возможны все схемы освещения, а в люминесцентном микроскопе осуществимы только схемы (б) и (г).

8.2.2. Спектрофлуориметр

Спектрофлуориметры служат для регистрации *интегральной* яркости свечения исследуемого объекта и распределения энергии в спектрах флуоресценции и спектрах возбуждения флуоресценции.

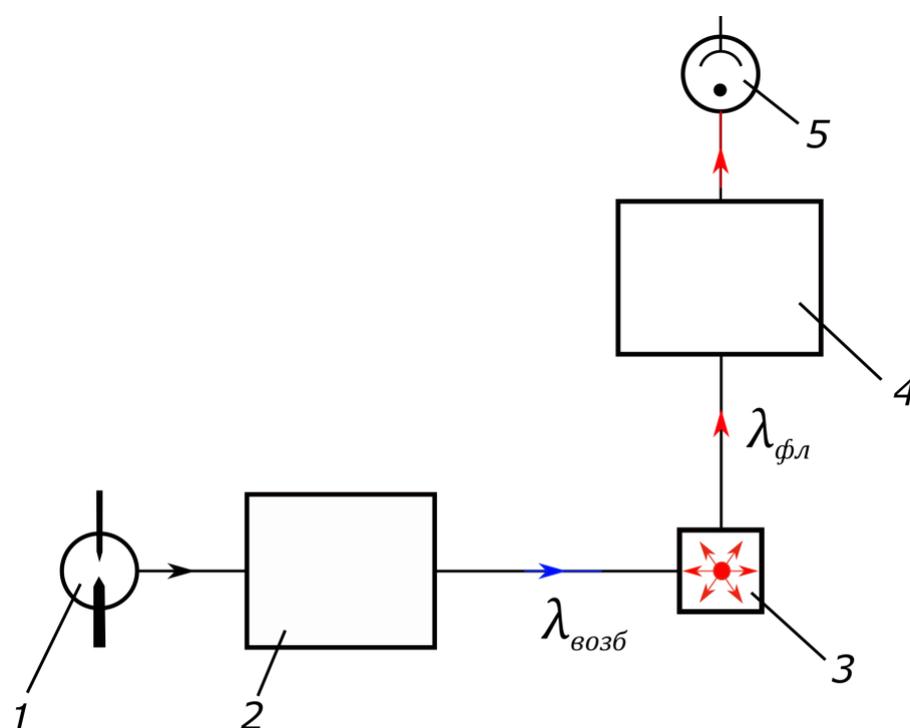


Рис. 8.6. Принципиальная схема спектрофлуориметра.

1 – источник света; 2 – монохроматор возбуждения; 3 – кювета; 4 – монохроматор флуоресценции; 5 – приемник излучения.

На рис. 8.6. приведена схема типичного спектрофлуориметра. В качестве источника света 1 чаще всего используют газоразрядные лампы, например, ксеноновые, имеющие непрерывный спектр в видимой и УФ области. Выделение определенных спектральных интервалов в пучках возбуждающего света ($\lambda_{\text{возб}}$) и света флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}}$) осуществляют с помощью двух независимых монохроматоров – 2 и 4. В кювете 3 свет флуоресценции распространяется во всех направлениях, и только небольшая его часть попадает в монохроматор 4. Иногда вместо одного

из монохроматоров устанавливают светофильтры либо для возбуждения флуоресценции, либо для регистрации флуоресценции.

8.2.3. Флуориметры

Флуориметр предназначен для измерения *интегральной* яркости свечения образца. Основными его компонентами являются источник света 1, светофильтры 2 и 4, кювета 3 с исследуемым веществом и приемник излучения 5 (рис. 8.7.). В установке для изучения флуоресценции приемник располагают вне пучка возбуждающего света (обычно под углом 90°).

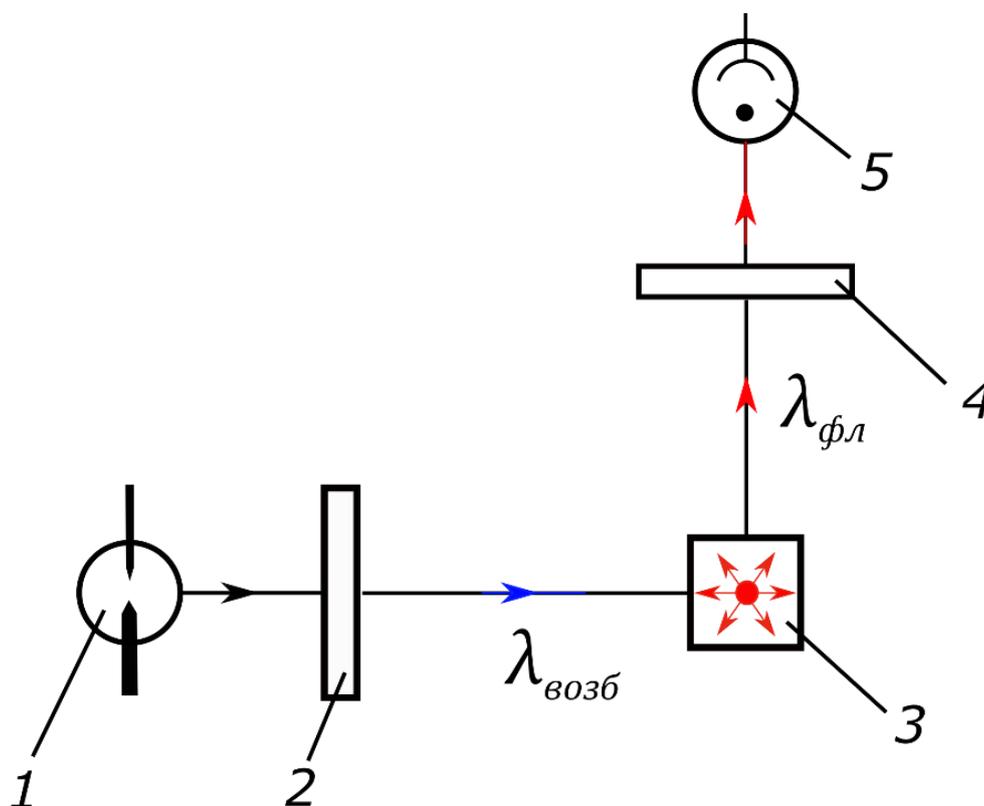


Рис. 8.7. Принципиальная оптическая схема флуориметра.

1 – источник света; 2 – возбуждающий светофильтр; 3 – кювета;
4 – запирающий светофильтр; 5 – приемник излучения.

Выбор длины волны возбуждения и регистрации флуоресценции. Возбуждающий и запирающий светофильтры подбирают с учетом спектров поглощения и флуоресценции [34]. При выборе оптимального диапазона длин волн возбуждения пользуются следующими правилами:

- длина волны возбуждения должна быть наиболее близкой к самой интенсивной линии источника света и одновременно близкой к максимуму спектра поглощения;

- длина волны возбуждающего света и область флуоресценции должны быть спектрально разделены, желательно на $t = 30 - 50 \text{ нм}$ (см. рис. 8.4.), для уменьшения возможности попадания в приемник рассеянного возбуждающего света (рассеяние на стенках кюветы, рэлеевское и комбинационное рассеяние растворителя);
- если исследуемое вещество имеет два или более максимумов в спектре поглощения, то в общем случае для возбуждения выбирается длинноволновый максимум, что позволяет свести к минимуму фотохимические изменения исследуемого вещества.

Широко применяют *абсорбционные* и *интерференционные* светофильтры. Абсорбционные светофильтры изготавливают из цветного стекла. Интерференционные светофильтры представляют собой стеклянные пластинки, на поверхность которых напыляют несколько чередующихся слоев металла и диэлектрика или различных диэлектриков.

Метод скрещенных светофильтров заключается в подборе возбуждающего и запирающего светофильтров с учетом спектров поглощения и люминесценции (рис. 8.8.).

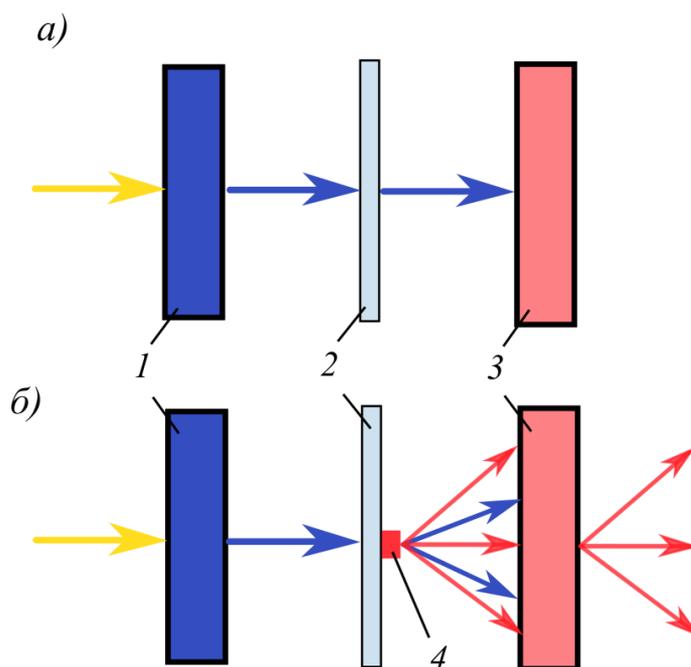


Рис. 8.8. Условие скрещенности светофильтров.

a) на предметном стекле объект отсутствует; *б)* на предметном стекле находится флуоресцирующий объект.

1 – возбуждающий светофильтр; 2 – предметное стекло или кювета; 3 – запирающий светофильтр; 4 – объект.

8.3. История создания люминесцентного микроскопа

В начале XX века оптики, включая Августа Кёлера (August Köhler, см. рис. 1.2.) и Карла Райхерта (Carl Reichert), занимались разработкой ультрафиолетового микроскопа. Одной из причин разработки такого прибора является повышение разрешающей способности, которая по теории Аббе зависит от длины волны. Однако разработчики столкнулись с неприятным побочным явлением в виде флуоресценции [3]. Первые люминесцентные микроскопы были разработаны между 1911 и 1913 годами немецкими физиками Отто Хаймштедтом (Otto Heimstädt) и Генрихом Леманом (Heinrich Lehmann) [3].

В 1911 г. русский ботаник М.С. Цвет (рис. 8.9.), создатель метода хроматографического адсорбционного анализа, одним из первых применил тогда еще несовершенный люминесцентный микроскоп для исследования хлорофилла и цианофилла в живых клетках. Дело в том, что зеленый пигмент растений – хлорофилл флуоресцирует ярким кроваво-красным цветом при его возбуждении фиолетово-синими лучами [35]. Впоследствии оказалось, что именно люминесцентная микроскопия полезна для изучения живых клеток в тканях и органах. Академику С.И. Вавилову, знакомому с работами М.С. Цвета, принадлежат слова: «Биологи, физики и химики в неоплатном долгу перед этим ученым» [36].



Рис.8.9. Михаил Семенович Цвет (1872 – 1919), русский ботаник-физиолог и биохимик растений, создатель хроматографического метода [4].

В дальнейшем люминесцентные микроскопы использовались для наблюдения *собственной флуоресценции (аутофлуоресценции или первичной флуоресценции)* бактерий, тканей животных и растений. Яркой

собственной флуоресценцией обладают продукты распада пигмента крови – гемоглобина (порфирины), некоторые витамины и антибиотики [35].

Станислав фон Провачек (Stanislav von Provazek) применил люминесцентную микроскопию для изучения связывания красителя в фиксированных тканях и живых клетках. Однако несравненно большее значение, чем собственная флуоресценция, имеет *вторичная флуоресценция*. Вторичная флуоресценция достигается путем «флуоресцентного окрашивания», т.е. обработкой объекта подходящими флуоресцирующими веществами – *флуорохромами*, которые вступают в химическую реакцию с определенными молекулами исследуемого вещества [35]. Метод маркировки антител *флуоресцентными красителями* разработал Альберт Кунс (Albert Coons) в начале 1940-х годов [3].

Зачем нужен люминесцентный микроскоп? Почему не устраивает исследование флуоресценции в кюветах с помощью спектрофлуориметра или флуориметра, а потребовалась разработка такого сложного прибора, представляющего собой «гибрид» микроскопа с флуориметром? Дело в том, что появилась потребность исследовать распределение флуоресцирующего вещества в поле зрения микроскопа, а не только получать интегральный, усредненный сигнал из кюветы. Микроскоп предоставляет возможность наблюдать в динамике проникновение, распределение и судьбу флуоресцирующих веществ как возникающих в организме в процессе нормального или болезненного обмена, так и искусственно вводимых в организм извне [35].

Люминесцентная микроскопия отраженного света была впервые разработана в конце 1920-х годов на базе металлографического микроскопа для наблюдения флуоресцентного излучения непрозрачных объектов. В этом приборе используется светоделительная пластинка с полупрозрачным зеркальным покрытием, общая эффективность которой составляет примерно 25% из-за потери 50% интенсивности при каждом прохождении через пластинку (см. главу 1, рис. 1.6.).

В середине 1930-х годов были разработаны компактные ртутные и ксеноновые газоразрядные лампы, что также способствовало переходу к люминесцентной микроскопии отраженного света. В этот же период были созданы различные марки цветных стекол для возбуждающих и запирающих светофильтров. В 1940-х годах разработка антибликовых покрытий и улучшенных сортов стекол привела к значительным усовершенствованиям объективов, характеристики которых отличались более высокой апертурой и качеством изображения, а также светопропусканием [3].

В начале 1950-х годов российские ученые, сотрудники ГОИ Брумберг, Гершгорин и Крылова (рис. 8.10.) разработали и применили в

схеме микроскопа *интерференционный светоделитель (дихроичное зеркало)*. Это новшество решило проблему потери света при использовании обычного полупрозрачного зеркала в осветителе отраженного света, а также максимально использовать яркость источника света [37, 38].



Е.М. Брумберг,
1907 – 1977

Т.Н. Крылова,
1901 – 1984

С.А. Гершгорин,
1907 – ?

Рис. 8.10. Российские ученые (сотрудники ГОИ), разработавшие интерференционный светоделитель (дихроичное зеркало) [4]. Инженер-оптик Гершгорин – первый выпуск ЛИТМО (1931).

Первые светоделительные пластинки отражали на препарат до 90% возбуждающего света и пропускали до 90% света флуоресценции. В конце 1960-х годов, т.е. через 20 лет, люминесцентные микроскопы отраженного света с интерференционным светоделителем получили широкое распространение во всех ведущих фирмах.

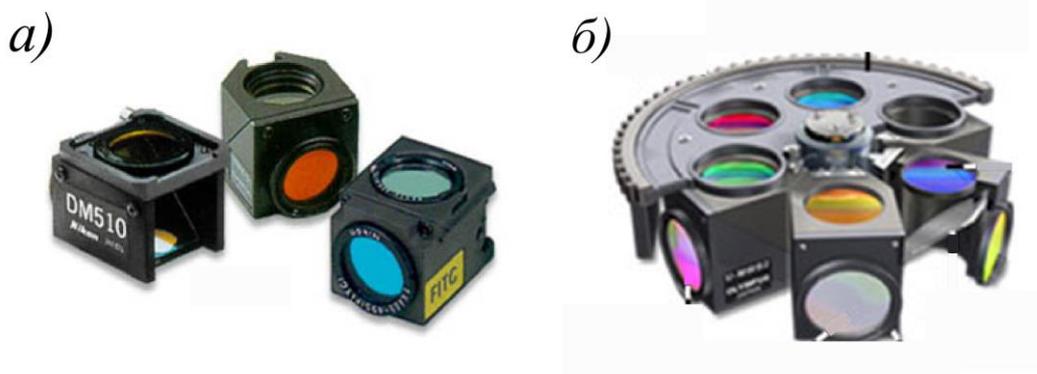


Рис. 8.11. Кубик-Рюет фирмы Nikon. [3]

а) набор кубиков для различных спектральных диапазонов возбуждения и флуоресценции; *б)* вращающаяся турель с кубиками.

Врач и исследователь Й.С. Плом (Johan Sebastiaan Ploem) предложил так называемый куб-Плом, конструкция которого содержит возбуждающий и запирающий фильтры и интерференционный светоделитель, размещенные вместе в небольшом кубике. Турель с набором кубиков, расположенная над объективом, позволяет достаточно быстро менять различные комбинации фильтров (рис. 8.11.).

8.4. Люминесцентный микроскоп проходящего света

Оптическая схема люминесцентного микроскопа проходящего света представлена на рис. 8.12. Коллектор 2 проецирует источник света 1 в плоскость апертурной диафрагмы конденсора 3. Между коллектором и конденсором располагают возбуждающий светофильтр 7. Конденсор 3 создает изображение полевой диафрагмы в плоскости препарата 4. Объектив 5 собирает свет флуоресценции объекта вместе со значительным количеством возбуждающего света. Между объективом 5 и окуляром 6 располагают запирающий светофильтр 8. Объектив формирует изображение объекта в свете флуоресценции в плоскости полевой диафрагмы окуляра.

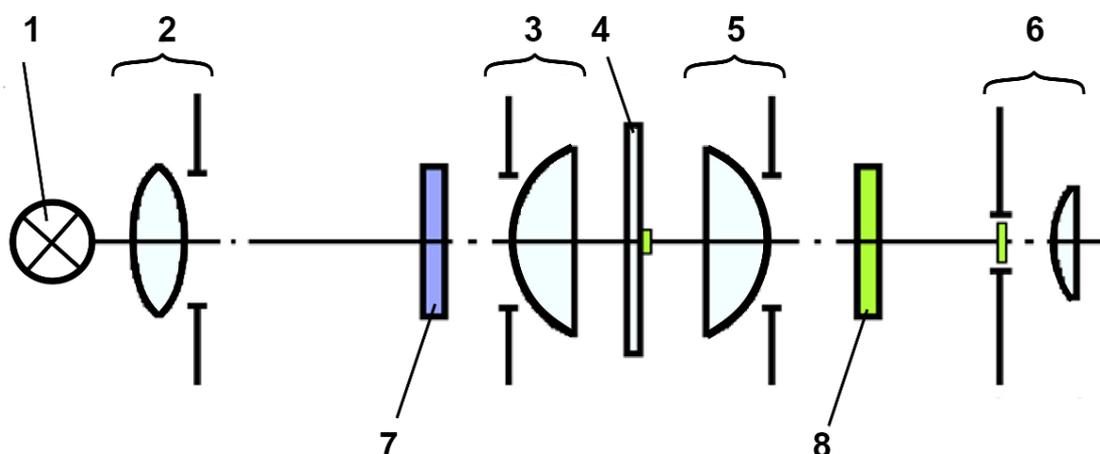


Рис. 8.12. Оптическая схема люминесцентного микроскопа проходящего света.

1 – источник света (ртутная или ксеноновая лампа); 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – окуляр; 7 – возбуждающий светофильтр; 8 – запирающий светофильтр.

Основной задачей любого люминесцентного микроскопа является формирование цветного изображения на темном фоне, т.е. получение цветного изображения самосветящихся структур объекта на темном нефлуоресцирующем фоне. Выполнение этой задачи зависит от скрещенности светофильтров (см. п. 8.2.2., рис. 8.8.). В представленной схеме расположение пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции соответствует схеме (б), изображенной на рис. 8.5. В этой конфигурации очень сложно обеспечить

хорошую скрещенность светофильтров 7 и 8, так как интенсивность возбуждающего света на несколько порядков больше интенсивности флуоресцентного излучения. Улучшить условие скрещенности возможно за счет применения темнопольного конденсора.

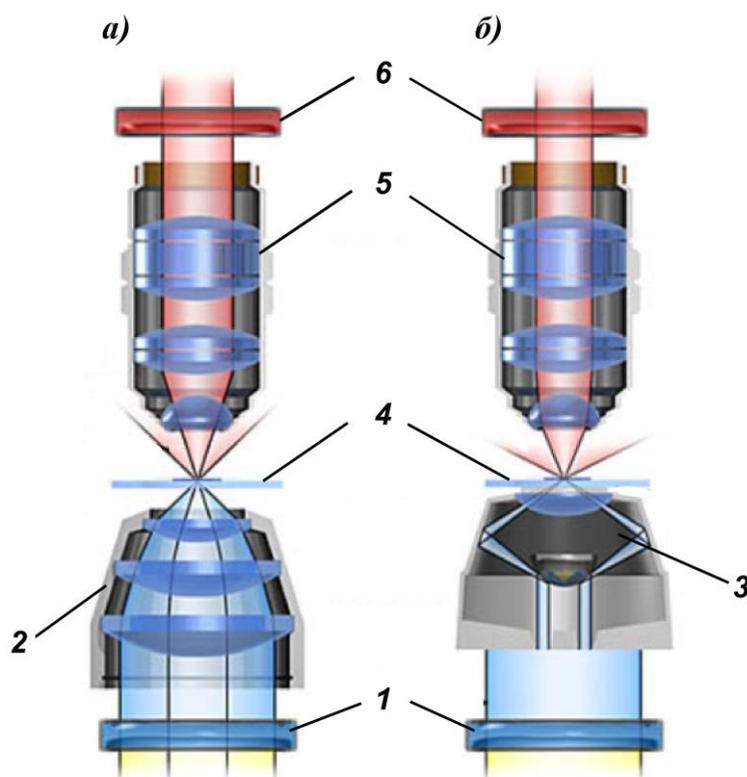


Рис. 8.13. Схемы люминесцентных микроскопов проходящего света [3].

а) в светлом поле; б) в темном поле.

1 – возбуждающий светофильтр; 2 – конденсор светлого поля; 3 – конденсор темного поля; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – запирающий светофильтр.

На рис. 8.13. для сравнения представлены две наиболее распространенные принципиальные схемы люминесцентных микроскопов проходящего света. Схема светлого поля (рис. 8.13.а.) соответствует традиционному микроскопу проходящего света с добавлением возбуждающего и запирающего фильтров, как показано на рис. 8.12. На рис. 8.13.б. используется темнопольный иммерсионный конденсор кардиоидного типа (см. главу 3, рис. 3.2.), который проецирует лучи возбуждающего света на препарат под большими углами, предотвращая прямое попадание геометрических лучей возбуждающего света в объектив. Тем не менее, в обоих случаях в объектив попадает рассеянный в препарате возбуждающий свет, который трудно отделить от света флуоресценции без значительного уменьшения его интенсивности за счет необходимости применения плотного запирающего фильтра.

Хотя использование иммерсионного темнопольного конденсора помогает устранить большую часть фонового шума, тем не менее, качество изображения в этих микроскопах страдает из-за остаточного

рассеянного возбуждающего света. Рассеянный свет ухудшает разрешение, а применение плотного фильтра снижает яркость изображения светящегося объекта.

8.5. Люминесцентный микроскоп отраженного света

Использование люминесцентного микроскопа отраженного света является наиболее распространенным способом наблюдения и регистрации изображений объектов в свете флуоресценции. В приборе расположение пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции соответствует схеме (з), изображенной на рис. 8.5.

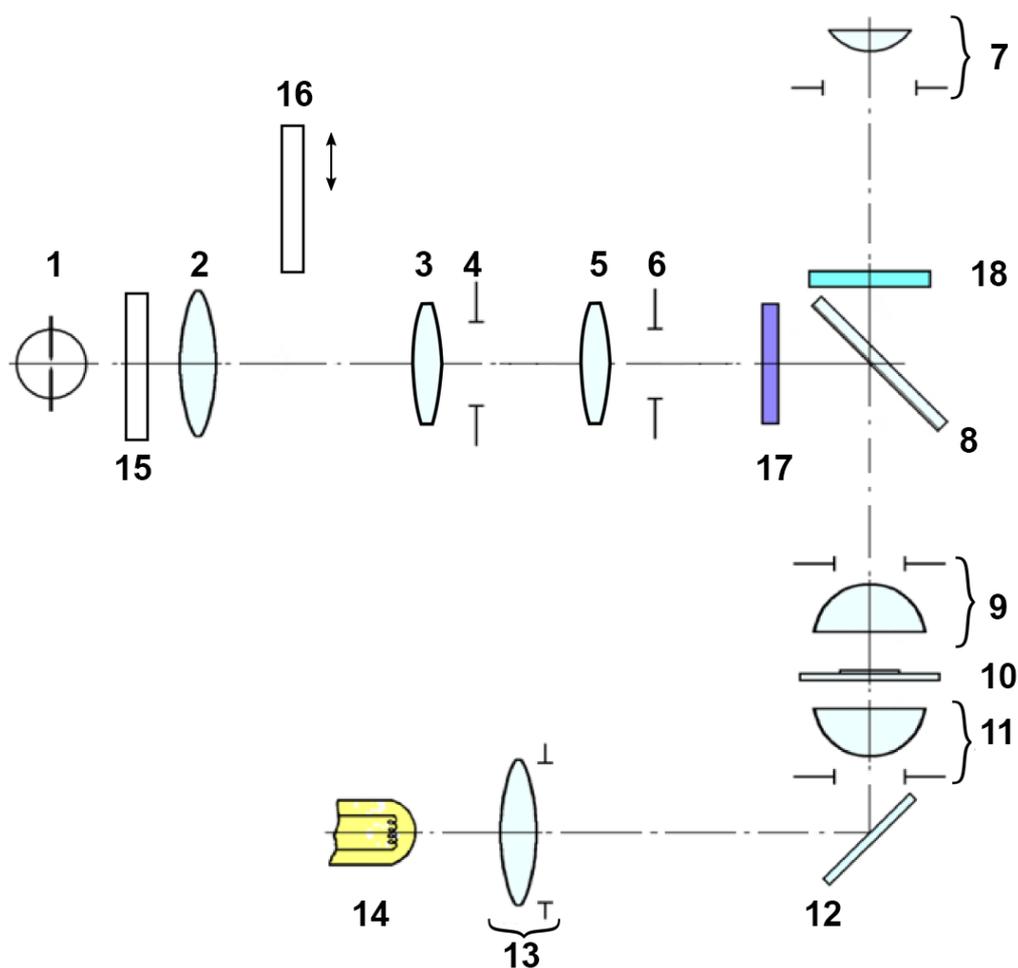


Рис. 8.14. Оптическая схема люминесцентного микроскопа в отраженном свете.

1 – газоразрядная лампа; 2 – коллектор; 3 и 5 – линзы; 4 – апертурная диафрагма; 6 – полевая диафрагма; 7 – окуляр; 8 – светоделительная пластинка (дихроичное зеркало); 9 – объектив; 10 – препарат; 11 – конденсор; 12 – поворотное зеркало; 13 – коллектор; 14 – лампа накаливания; 15 – теплозащитный светофильтр; 16 – широкополосный светофильтр; 17 – возбуждающий светофильтр; 18 – запирающий светофильтр.

На рис. 8.14. представлена оптическая схема люминесцентного микроскопа отраженного света с возможностью наблюдения комбинированного изображения. В осветительной системе отраженного света излучение источника 1 проецируется коллектором 2 и линзой 3 в плоскость апертурной диафрагмы 4, затем линзой 5 и светоделительной пластинкой 8 переносится в плоскость выходного зрачка объектива 9. Полевая диафрагма 6 объективом 8 проецируется в плоскость объекта на препарате 10. Из общего излучения источника возбуждающий свет выделяется с помощью светофильтра 17. Для предохранения светофильтров и линз от нагрева ртутной лампой предусмотрен теплозащитный фильтр 15. Изображение объекта в свете флуоресценции формируется объективом 9 в плоскости полевой диафрагмы окуляра 7. Рассеянный в системе наблюдения возбуждающий свет устраняется с помощью запирающего светофильтра 18. Во многих моделях микроскопа фильтры 17, 18 и пластинка 8 конструктивно объединены в виде кубика (см. рис. 8.11.).

При освещении в проходящем свете излучение источника 14 коллектором 13 и зеркалом 12 проецируется в плоскость апертурной диафрагмы конденсора 11. Конденсор создает изображение полевой диафрагмы коллектора в плоскости объекта 10. Изображение объекта наблюдают с помощью объектива 9 и окуляра 7.

Подготовку микроскопа к работе начинают с настройки освещения по Кёлеру в проходящем свете с использованием в качестве источника света лампы накаливания 14, коллектора 13 и конденсора 11. Этот режим освещения применяют по следующим причинам:

- 1) предохранение объекта от повреждения под действием возбуждающего света;
- 2) получение комбинированного изображения.

Под действием возбуждающего света объект подвергается *фотообесцвечиванию* (см. рис. 8.17.), поэтому для уменьшения времени его облучения настройку изображения и поиск исследуемого участка на препарате осуществляют в щадящем свете лампы накаливания.

Достаточно часто флуоресцируют лишь небольшие структуры объекта. В результате в свете флуоресценции на темном фоне видны только эти структуры, и сложно установить, в каких именно элементах объекта они находятся. При одновременном освещении препарата сверху и снизу флуоресцирующие структуры видны на фоне элементов объекта, выявленных, например, фазовым контрастом или ДИК.

На рис. 8.15. представлен в разрезе люминесцентный микроскоп фирмы Olympus. Вольфрамо-галогенная лампа установлена в фонаре 1, а ртутная или ксеноновая лампа – в фонаре 2. На рисунке синим цветом изображен возбуждающий свет, красным – свет флуоресценции [3].

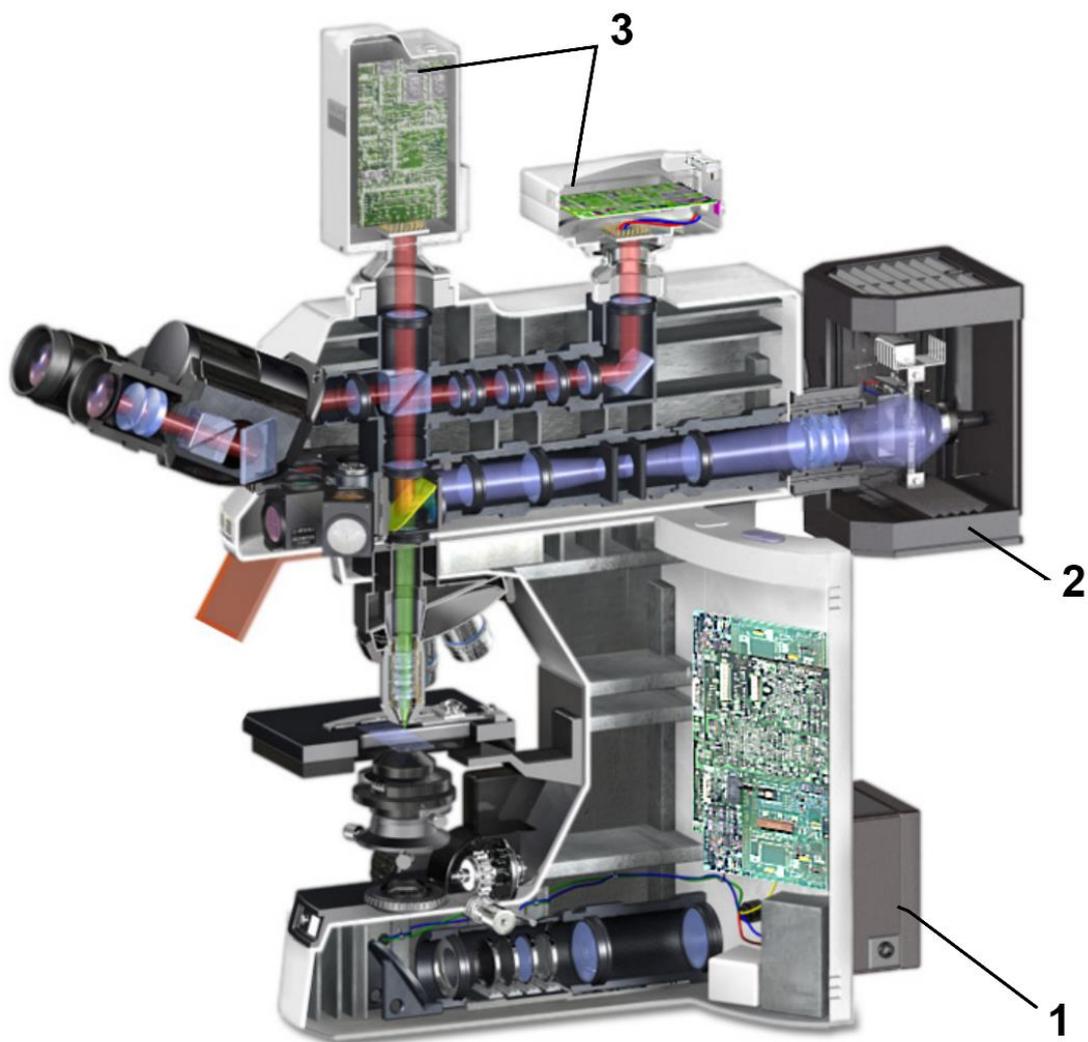


Рис. 8.15. Люминесцентный микроскоп фирмы Olympus в разрезе [3].

1 – фонарь с лампой накаливания; 2 – фонарь с газоразрядной лампой; 3 – цифровые фотокамеры.

На рис. 8.16 представлена в разрезе модель инвертированного люминесцентного микроскопа. На стойке в фонаре 1 установлена вольфрамо-галогенная лампа. Ртутная или ксеноновая лампа установлена в фонаре 2, который крепится на специальном кронштейне. На рисунке желтым цветом изображен проходящий свет, синим – возбуждающий свет, красным – свет флуоресценции. Микроскоп комплектуют вращающимся столиком, нагревательными пластинами, держателями чашек Петри и т.п. [3].

Прибор содержит объективы, имеющие большое рабочее расстояние, и объективы водной иммерсии с возможностью их погружения в водный раствор. Инвертированный микроскоп является

инструментом для проведения исследований флуоресценции на живых клетках и тканях.

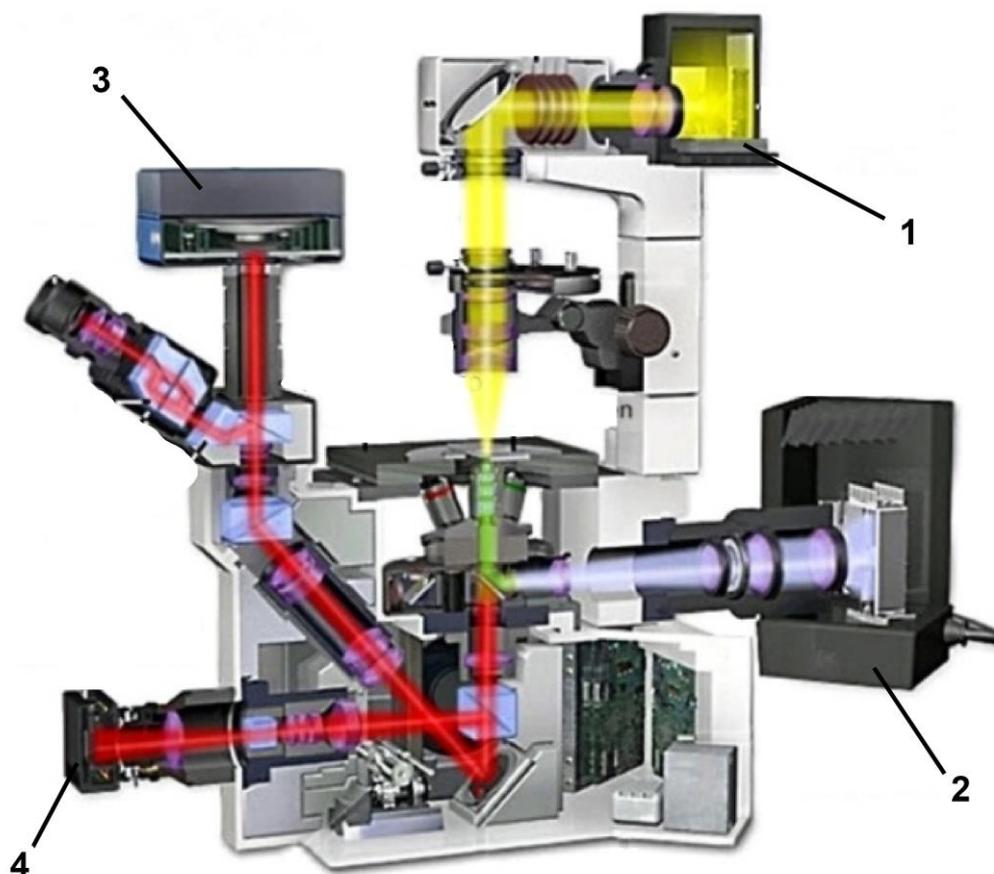


Рис.8.16. Инвертированный люминесцентный микроскоп ф. Olympus в разрезе [3].

1 – фонарь с лампой накаливания; 2 – фонарь с газоразрядной лампой; 3 и 4 – цифровые фотокамеры.

8.5.1. Фотообесцвечивание

Явление *фотообесцвечивания* (встречаются термины: *фотовыцветание*, *выгорание*, *отбеливание*, *photobleaching* и др.) происходит под действием возбуждающего света, когда флуоресцирующее вещество постоянно теряет способность флуоресцировать из-за его химического повреждения.

Для конкретного вещества среднее число циклов возбуждения и эмиссии перед фотообесцвечиванием зависит от молекулярной структуры и ее окружения. Некоторые флуоресцентные красители быстро обесцвечиваются уже после нескольких циклов испускания фотонов, в то время как другие, более устойчивые, могут подвергаться тысячам или миллионам циклов до обесцвечивания.

Фотообесцвечивание приводит к потере интенсивности флуоресценции и изменению формы спектральной кривой. Кроме того,

число циклов возбуждения и излучения является постоянной величиной для данного флуорохрома независимо от вида доставки энергии возбуждения: дискретными импульсами или непрерывным освещением. Уменьшение интенсивности возбуждающего света, например, с помощью нейтральных фильтров, замедляет процесс фотообесцвечивания, но не предотвращает его [3].

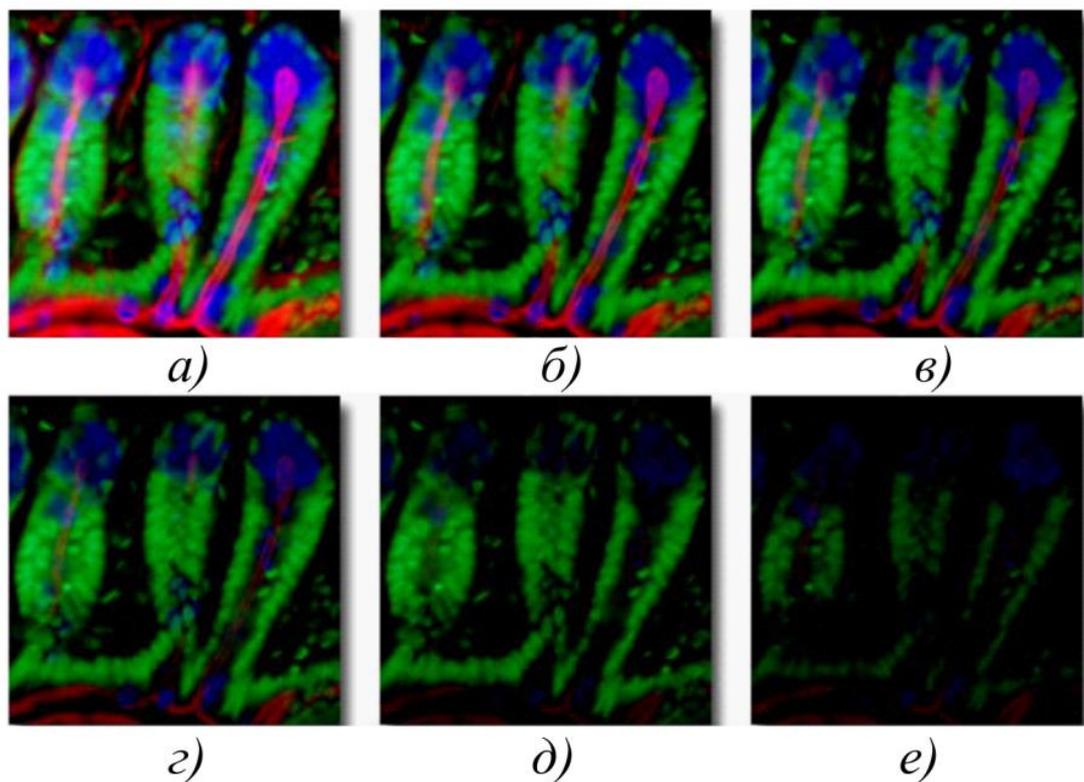


Рис. 8.17. Срез ткани кишечника мыши, окрашенный тремя разными красителями, флуоресцирующими красным, зеленым и синим цветами при постоянном облучении объекта возбуждающим светом [3].

На рис. 8.17. представлен типичный пример фотообесцвечивания, наблюдаемого на серии изображений, последовательно снятых через каждые две минуты при непрерывном облучении объекта возбуждающим светом. Срез ткани кишечника мыши окрашен тремя разными флуоресцентными красителями, отличающихся временем фотообесцвечивания. В результате различные структуры ткани, флуоресцирующие синим, зеленым и красным цветами, выцветают по-разному:

- а) три красителя имеют относительно высокую интенсивность свечения;
- б) через 2 минуты интенсивности синего и красного цветов начинают быстро снижаться по сравнению с зеленым;
- в) через 4 минуты интенсивности синего и красного цветов продолжают снижаться по сравнению с зеленым;

- г) через 6 минут синий и красный цвета почти не видны;
- д) через 8 минут синие и красные цвета полностью исчезли, а интенсивность зеленого цвета значительно уменьшилась;
- е) через 10 минут все три красителя практически не светятся.

Следует обратить внимание на то, что при постоянном облучении интенсивность свечения красителей снижается, но с разной скоростью. Зеленый краситель оказался наиболее устойчивым к выцветанию.

8.5.2. Газоразрядные источники света

Конструкции ртутных и ксеноновых ламп очень похожи, за исключением размеров и газа, заключенного в колбе лампы.

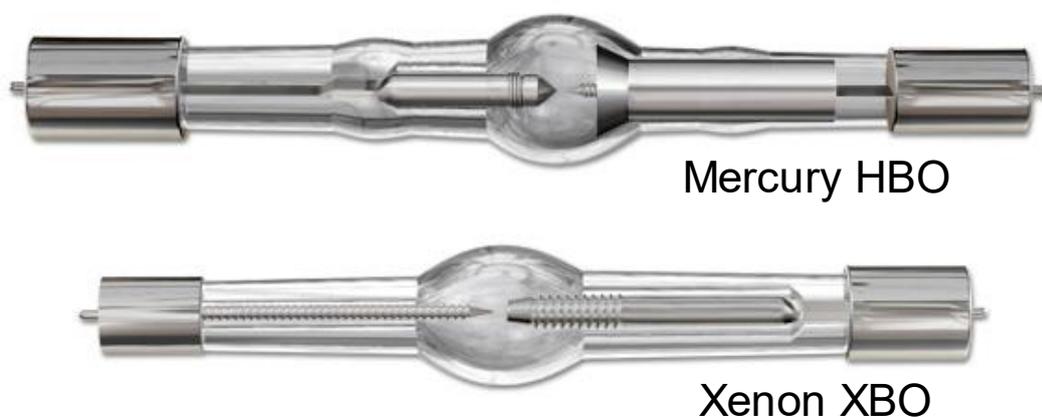


Рис. 8.18. Газоразрядные ртутная и ксеноновая лампы [3].

Выбор источника света зависит от спектрального состава, яркости, стабильности и размера светящегося тела по сравнению с размером выходной апертуры объектива. Выбор источника также зависит от поглощения и квантового выхода флуоресцентного красителя. Яркость газоразрядных ламп в 10 –100 раз превышает яркость ламп накаливания, обычно используемых для освещения проходящим светом. Наконец, фонарь должен быть достаточно прочным, чтобы выдержать возможный взрыв лампы во время работы.

8.5.3. Интерференционный светоделитель с фильтрами

Интерференционный светоделитель (дихроичное зеркало) является наиболее важным элементом люминесцентного микроскопа отраженного света. Дело в том, что для увеличения яркости флуоресценции объекта необходимо увеличивать интенсивность возбуждающего света за счет увеличения мощности газоразрядной лампы, что целесообразно лишь до определенных пределов. Увеличить яркость флуоресценции можно двумя способами:

- использовать флуоресцентные красители с высоким квантовым выходом;
- наиболее полно использовать энергию возбуждающего света.

Второй способ был разработан российскими учеными (см. рис. 8.10.). Современные интерференционные светоделители отражают на препарат до 99% возбуждающего света и пропускают до 99% света флуоресценции, что позволяет в 4-5 раз повысить эффективность использования возбуждающего света по сравнению с традиционными светоделителями металлографических микроскопов.

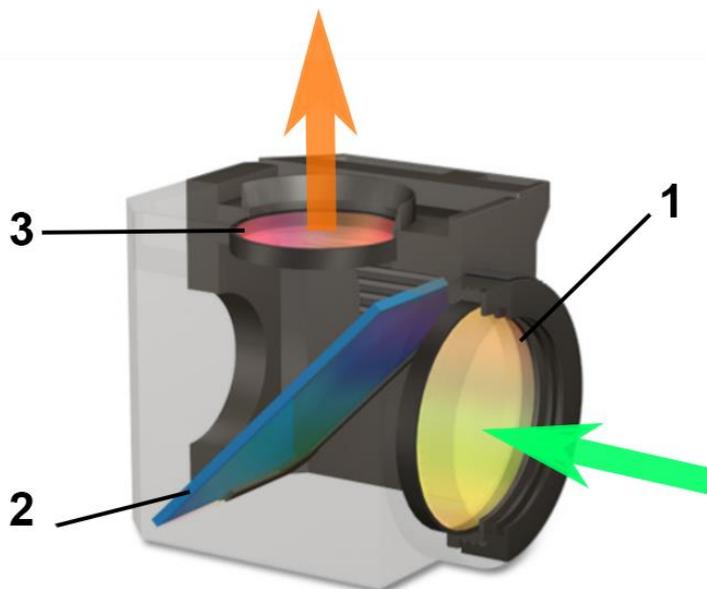


Рис. 8.19. Кубик с интерференционным светоделителем и фильтрами.

1 – возбуждающий светофильтр; 2 – интерференционная светоделительная пластинка; 3 – запирающий светофильтр [3].

После возбуждающего светофильтра 1 (рис. 8.19.) свет направляется на светоделитель 2, расположенный под углом 45 градусов к оптическим осям микроскопа. Интерференционное покрытие обращено к источнику света и отражает до 99% возбуждающих лучей на препарат. Светоделитель также работает в качестве дополнительного запирающего фильтра для пропускания флуоресцентного излучения от объекта к плоскости изображения. Благодаря этому требования к запирающему фильтру 3 становятся менее критичными. Кроме того, он направляет обратно к источнику рассеянные и отраженные от препарата возбуждающие лучи, снижая тем самым уровень фоновой засветки изображения.

На рис. 8.20. представлены спектральные кривые пропускания возбуждающего фильтра 1 (синего цвета), запирающего фильтра 2 (красного цвета) и светоделительной пластинки 3 (серого цвета). Волнистая синусоидальная линия на кривой 3 связана с интерференцией

в тонких пленках, нанесенных на пластинку. При наличии в спектрах пропускания коротковолновых или длинноволновых «крыльев» в оптическую схему микроскопа вводят дополнительный широкополосный фильтр 16 (см. рис. 8.14.).

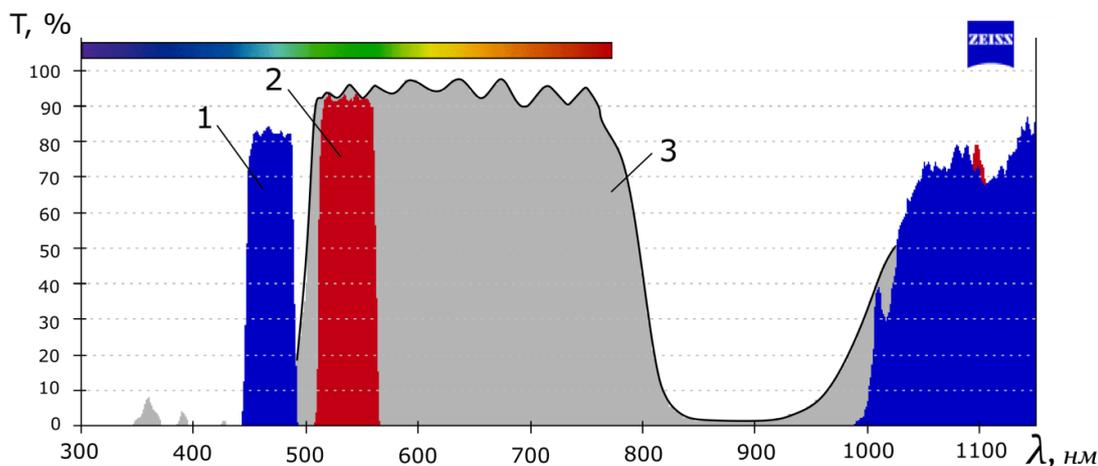


Рис. 8.20. Спектральные кривые пропускания светофильтров и светоделителя.

1 – кривая пропускания возбуждающего светофильтра; 2 – кривая пропускания запирающего светофильтра; 3 – кривая пропускания и отражения интерференционной светоделительной пластинки.

8.5.4. Объективы люминесцентного микроскопа

В микроскопах отраженного света интенсивность изображения является функцией числовой апертуры и увеличения объектива. Фактически, интенсивность излучения I пропорциональна четвертой степени числовой апертуры, но обратно пропорциональна квадрату увеличения:

$$I \sim k (A)^4 / V^2,$$

где A – числовая апертура объектива; V – увеличение, k – коэффициент пропорциональности. Из этого соотношения следует, что самые яркие флуоресцентные изображения будет формировать объектив с высокой числовой апертурой и малым увеличением. Например, объектив $60 \times 1,4$ даст более яркие изображения, чем объектив $100 \times 1,4$ с той же числовой апертурой. Увеличение количества линз приводит к соответствующему увеличению собственной флуоресценции и уменьшению интенсивности из-за внутренних отражений от поверхностей линз. Зачастую компромисс достигается изготовителями специальных объективов для люминесцентной микроскопии (рис. 8.21.).

Эти объективы изготовлены из нефлуоресцирующих стекол с антибликовым покрытием для уменьшения фоновой флуоресценции и получения изображения с высокой контрастностью. На объективах для люминесцентного микроскопа ставятся знаки, например, «Л» или «Fl», что говорит об отсутствии у них собственной флуоресценции.



Рис. 8.21. Комплект объективов для люминесцентного микроскопа, ф. Zeiss [3].

На рис. 8.22. представлены два изображения клеток мха: а) в проходящем свете с лампой накаливания; б) в свете флуоресценции при возбуждении синей линией ртутной лампы. Под действием возбуждающего света хлорофилл в клетке мха флуоресцирует красным цветом (собственная флуоресценция).

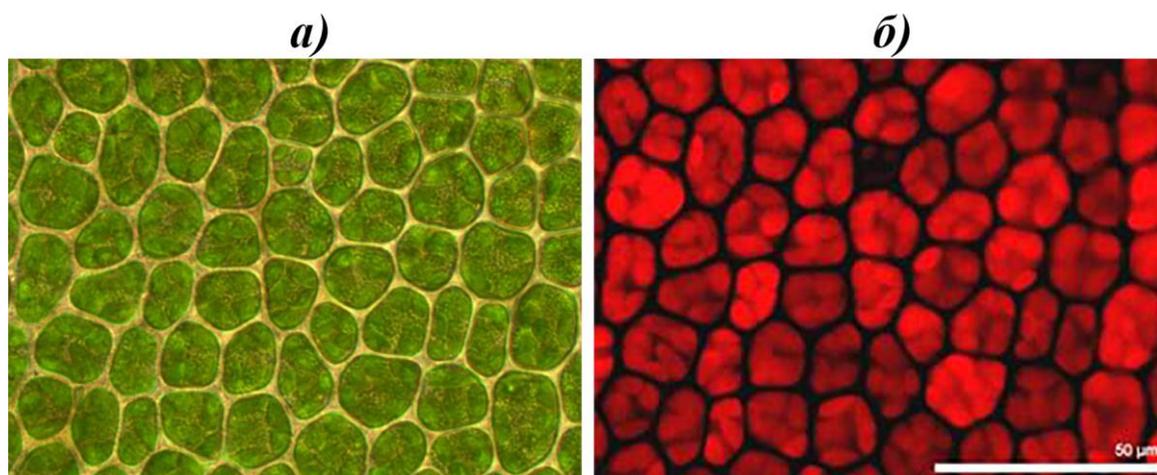


Рис. 8.22. Клетки мха (*plagiomnium undulatum*) в проходящем свете (а) и в свете флуоресценции (б) [4].

На рис. 8.23. представлена серия изображений раковой клетки человека, фиксированной в момент ее деления. Клетку окрашивают тремя флуоресцентными красителями. Каждый краситель химически взаимодействует с определенным компонентом клетки. В результате ДНК, окрашенная красителем DAPI, флуоресцирует синим цветом при возбуждении 365 нм (рис. 8.23.а.), белок центромеры, окрашенный красителем INCENP, флуоресцирует зеленым цветом при возбуждении 475 нм (рис. 8.23.б.), а микротрубочки, окрашенные красителем AlexaFluor, – красным при возбуждении 580 нм (рис. 8.23.в.).

С помощью цифровой CCD-камеры последовательно получают три изображения одной и той же клетки, меняя кубики в микроскопе, т.е. меняя комбинации возбуждающих и запирающих фильтров (источник света – ксеноновая лампа) [4].

Компьютерное совмещение трех изображений (*а*, *б* и *в*) позволяет получить цветное изображение клетки (рис. 8.23.г.). Этот метод совмещения называют методом мультифлуоресцентного изображения.

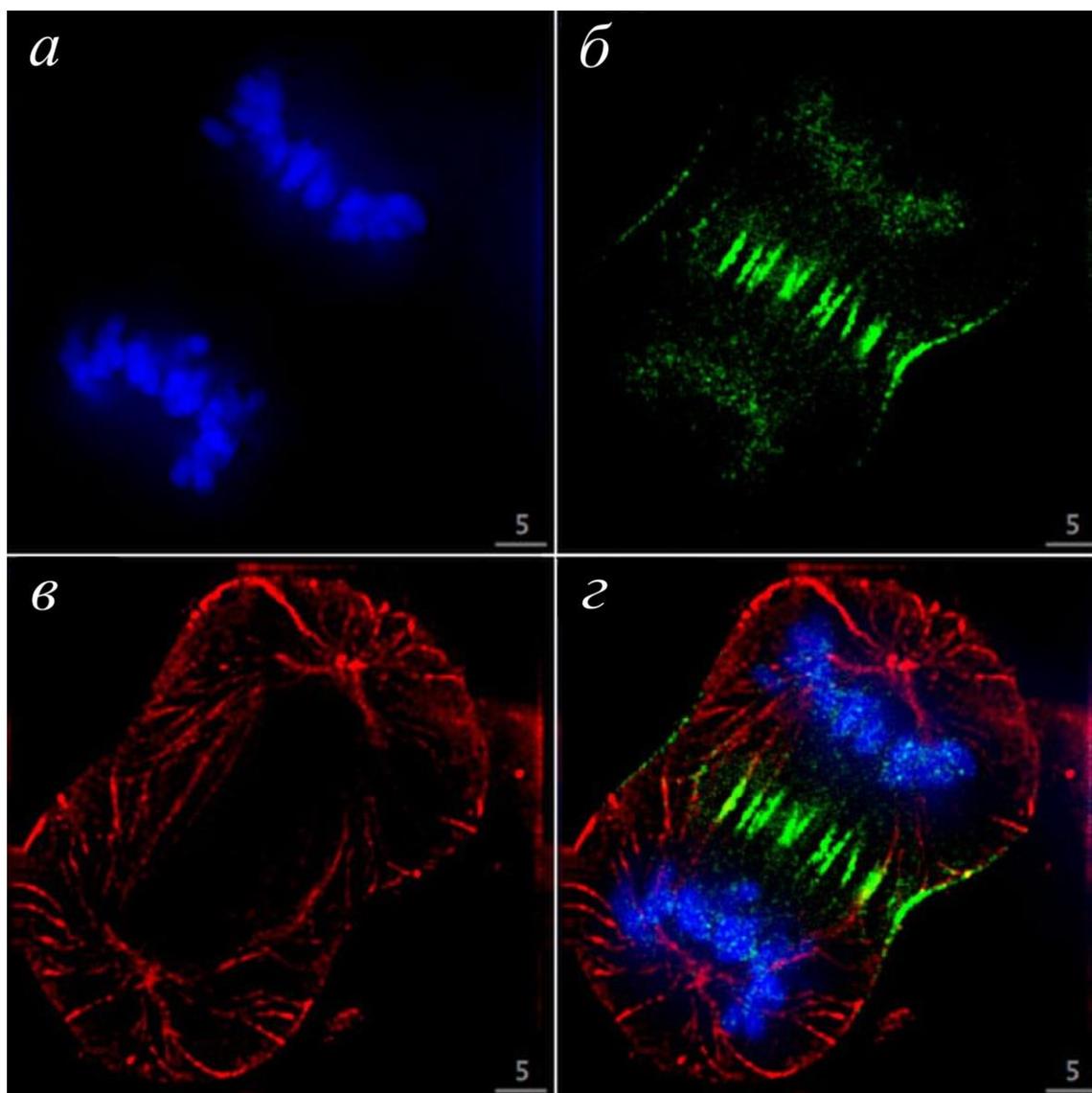


Рис. 8.23. Изображения в свете флуоресценции раковой клетки человека, фиксированной в процессе ее деления [4].

а) ДНК, окрашенная красителем DAPI; *б*) белок центромеры, окрашенный красителем INCENP; *в*) микротрубочки, окрашенные красителем AlexaFluor; *г*) мультифлуоресцентное изображение, полученное при компьютерном совмещении.

Заключение

Основными достоинствами люминесцентной микроскопии являются:

- высокая чувствительность метода;
- цветное изображение;

- высокая степень контрастности изображения объекта на темном фоне;
- возможность исследования живых объектов благодаря малым концентрациям красителя;
- возможность обнаружения и топографической локализации различных структур объекта.

Однако к оптической системе люминесцентного микроскопа предъявляются следующие специфические требования:

- высокая степень скрещенности возбуждающего и запирающего светофильтров;
- отсутствие собственной флуоресценции у всех компонентов в оптической схеме и у всех используемых материалов (линз, фильтров, предметных и покровных стекол, иммерсионных жидкостей и т.п.).

Теоретически пространственное разрешение люминесцентного микроскопа ограничено дифракционным пределом, но фактически он способен выявить присутствие одной молекулы.

Контрольные вопросы

1. Что означает термин «скрещенность» в люминесцентном микроскопе?
2. Какой тип освещения и почему наиболее часто применяется в люминесцентных микроскопах – в проходящем или отраженном свете?
3. По каким характеристикам выбирают источники света? Какие источники наиболее часто применяют в люминесцентной микроскопии?
4. Какие дополнительные требования предъявляют к объективам?

Глава 9. ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ

В предыдущих главах предполагалось, что прием и анализ изображения осуществляет зрительный анализатор человека. В этом случае микроскоп «вооружает» глаз, позволяя разглядеть объект или его структуру, невидимые или плохо различимые невооруженным глазом. Естественное желание исследователя иметь фотографию увиденного изображения привело к разработке фотонасадки для получения негативного изображения на фотопленке, а затем позитивного – на фотобумаге.

Напомним, что зрительный анализатор человека работает подобно телевизионной камере, снабженной автоматической системой слежения. Причем эта камера самофокусируется, автоматически подстраивается к изменениям интенсивности света, имеет самоочищающуюся линзу и присоединена к компьютеру с программным обеспечением для обработки информации, т.е. к мозгу. Через окуляр глаз рассматривает мнимое изображение на расстоянии наилучшего видения [1].

Фотоаппарат работает по-другому. На фотопленку или ПЗС-матрицу проецируют действительное изображение объекта. Для получения качественной фотографии предъявляется более высокое требование к равномерности освещения объекта по сравнению с визуальным наблюдением. Фактически Кёлер разработал метод освещения, известный как метод освещения по Кёлеру, именно для фотосъемки. Он искал способ улучшить качество фотографий за счет усовершенствования осветительной системы, а результат работы опубликовал в 1893 году [4].

При визуальном наблюдении качество изображения зависит от коррекции аберраций объектива и окуляра. При этом основная нагрузка по коррекции лежит именно на объективе. Окуляр отвечает за исправление остаточных аберраций, в частности, хроматизма, если его не удалось исправить в объективе. Например, так называемые компенсационные окуляры обладают хроматизмом с обратным знаком по отношению к остаточному хроматизму объектива. Поэтому вместо окуляра перед фотокамерой устанавливают оптическую систему, которая берет на себя компенсацию остаточных аберраций объектива и согласует размер и резкость изображения в визуальном канале и канале фоторегистрации. Такую систему называют фотоокуляром или адаптером.

9.1. Фотонасадка с пленочной фотокамерой

На рис. 9.1. представлена фотонасадка, в которой изображение проектируется в плоскость фотопленки. Качество фотографии зависит от качества исходного изображения: подготовки препарата, настройки

освещения, подбора фильтров. Кроме этого, качество снимка зависит от самой фотопленки, ее экспонирования и химической обработки при проявлении и печати на фотобумаге. И только после этого исследователь может увидеть и отобрать полученные изображения в качестве документа. На фотоснимках более четко проявляются недостатки настройки аппаратуры, которые не сразу видны глазом через окуляр микроскопа. Это объясняется тем, что глаз и фотоаппарат «видят» по-разному.



Рис. 9.1. Фотонасадка к микроскопу с фотопленкой [3].

9.2. Цифровые фотонасадки

Цифровая камера связана с ЖК-экраном, который позволяет предварительно просматривать и выбирать удачные изображения для последующей регистрации и компьютерной обработки. Поэтому неудивительно, что цифровые фотокамеры практически вытеснили пленочные.

В микроскопии применяют ПЗС-матрицы с размером пикселей менее $6,7 \text{ мкм}$ [3]. Фильтры, находящиеся перед ПЗС-матрицей, делят пиксели на «красные», «зеленые» и «синие» для формирования цветного

изображения. ПЗС-матрица преобразует свет в электрические заряды, величина которых пропорциональна интенсивности света.

Для микроскопов простых конструкций выпускают цифровые видеоокуляры (рис. 9.2.). Видеоокуляр устанавливают вместо обычного окуляра в один из тубусов бинокулярной насадки. Безусловно, это очень неэргономично, так как фотокамера «висит» перед лицом оператора и, кроме того, пропадает возможность бинокулярного наблюдения объекта.



Рис. 9.2. Цифровые фотоокуляры: фотоокуляр ф. Olympus (слева) и видеоокуляр ToprCam 1,31 Мп (справа) [4].

Для получения высококачественных цифровых изображений следует использовать микроскопы, которые оснащены фотонасадкой и комплектом объективов с хорошей коррекцией aberrаций, например, план-апохроматами с длиной тубуса «бесконечность» (рис. 9.3.). В этом случае оптическая схема адаптера содержит специально рассчитанную тубусную линзу.

Современные цифровые камеры в сочетании с программным обеспечением позволяют получать качество изображения, сопоставимое с традиционными фотографиями на пленках из галогенида серебра. Кроме того, цифровые камеры проще в эксплуатации, обработке изображения и их хранения. Для работы с флуоресценцией зачастую применяют монохромные высокочувствительные цифровые камеры с охлаждением при помощи элемента Пельтье. Такие камеры позволяют получать качественные изображения биологических объектов в условиях очень низкой освещенности.

Цифровые изображения могут быть отправлены по электронной почте для консультации и обсуждения, включены в другие цифровые документы, экспортированы в системы анализа изображений или

размещены на сайте, поскольку их легко копировать, хранить и архивировать.



Рис. 9.3. Микроскоп с цифровой фотокамерой Axio Scope.A1, Zeiss [4].

9.3. Компьютерная обработка и анализ цифровых изображений

Качество исходного цифрового изображения зависит от подготовки препарата, равномерности его освещения, условий регистрации и может иметь дефекты, связанные с наличием посторонних примесей, бликов, расфокусировок и т. п. Такое изображение подвергается обработке для достижения баланса между научной точностью и эстетическим впечатлением примерно в такой последовательности:

- исправление или уменьшение дефектов изображения;
- уточнение исследуемых деталей;
- выполнение измерений исследуемых структур.

Конечно, оригинальные изображения должны быть сохранены, а все этапы обработки задокументированы. На рис. 9.5. представлено цифровое изображение окрашенного среза двудольного листа эпидермиса, полученное в проходящем свете. На исходном изображении (а) заметны присутствие рассеянного света и неравномерность освещения по полю зрения, что привело к снижению контраста и отсутствию

четкости в деталях объекта. После компьютерной обработки (вычитания фона, регулировки оттенка, цветового баланса и насыщенности) качество и контраст изображения (б) существенно улучшились [3].

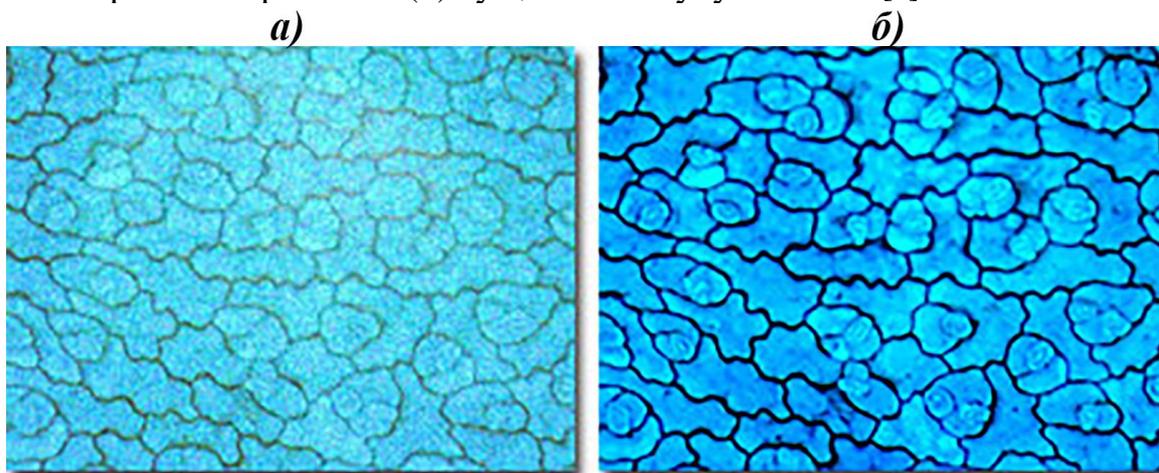


Рис. 9.5. Изображения окрашенного среза двудольного листа эпидермиса: а) исходное изображение; б) после компьютерной обработки [3].

Компьютерная обработка изображений служит для улучшения качества изображений, предназначенных для печати или последующему анализу. Анализ изображений представляет собой процесс получения числовых данных, которые используются для статистических расчетов и построения графиков.

Заключение

Необходимо помнить о различном восприятии одного и того же изображения зрительным анализатором человека через окуляр, т.е. через лупу, и на экране монитора. Мозг человека использует сложный алгоритм обработки изображения, позволяющий при наблюдении объекта через окуляр извлекать полезную информацию как при наличии сильных помех, так и в сложных условиях освещения. Искусственно созданные приемники излучения пока не обладают такими свойствами. В настоящее время опытный эксперт судит о настройке прибора именно по изображению в окуляре и сравнивает его с изображением на экране монитора, а не наоборот.

Контрольные вопросы

1. Какой тип изображения проектируется на матричный приемник цифровой камеры – действительное или мнимое? Какова роль адаптера?
2. Какие возможности и ограничения имеет компьютерная обработка изображений?

Глава 10. МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТР

Методы микроскопии, рассмотренные в предыдущих главах, предназначены для получения изображения объекта. С развитием и совершенствованием источников и приемников излучения, систем сканирования, автоматизации управления приборами и успехами вычислительной техники появилась возможность проводить не только качественные, но и количественные исследования отдельных структур объекта. В этом случае микроскоп и спектрофотометр представляют собой единый прибор – *микроспектрофотометр*. Измерительный канал микроскопа становится основным, а визуальный – вспомогательным. Иными словами, оптическая система микроскопа создает увеличенное изображение и позволяет выделить фотометрируемую структуру, обеспечивая тем самым высокую локальность измерений.

10.1. Фотометрия и спектрофотометрия

Переход к количественным измерениям требует ответов на вопросы: какие световые величины измеряют, единицы измерения, эталоны, калибровка и т.п. Кроме того, перед исследователем встает вопрос о достоверности полученных результатов и точности измерений. Количественные измерения относятся к разделу физической оптики, называемому фотометрией.

Фотометрия связана с процессами испускания, распространения, поглощения и рассеяния электромагнитного излучения оптического диапазона. К основным *световым величинам*, измеряемым в фотометрии, относятся: *световой поток, сила света, освещенность и яркость*. Приборы, предназначенные для измерения световых величин, называют *фотометрами* [18].

Спектрофотометрия предназначена для исследования спектральных характеристик излучения, поглощения и отражения света. Эмиссионная спектрофотометрия исследует излучение образца, являющегося источником света, на основе сравнения его с излучением эталона. Абсорбционная спектрофотометрия исследует поглощение, в котором излучение от выбранного источника посылают на образец и измеряют отношение интенсивности падающего и прошедшего *световых потоков*. Зависимость этого отношения от длины волны определяет спектр пропускания [18].

Спектрофотометр представляет собой оптический прибор, выполняющий одновременно функции *спектрометра* и *фотометра* и позволяющий измерять отношение интенсивностей двух световых потоков от длины волны [18].

10.2. Основные световые величины

Рассмотрим основные световые величины, связанные с энергетическими характеристиками излучения. Основной величиной, которая позволяет судить о количестве излучения, является поток излучения.

10.2.1. Поток излучения

Поток излучения (или просто поток) Φ – это величина энергии в заданном интервале длин волн (λ_1 - λ_2), переносимой полем в единицу времени через данную площадку S (рис.10.1.а.) Поток излучения Φ измеряется в ваттах ($1 \text{ Вт} = 1 \text{ Дж/с}$). Поток, содержащий узкий спектральный интервал $\Delta\lambda$ вблизи некоторой λ , принято считать *монохроматическим* потоком [6].

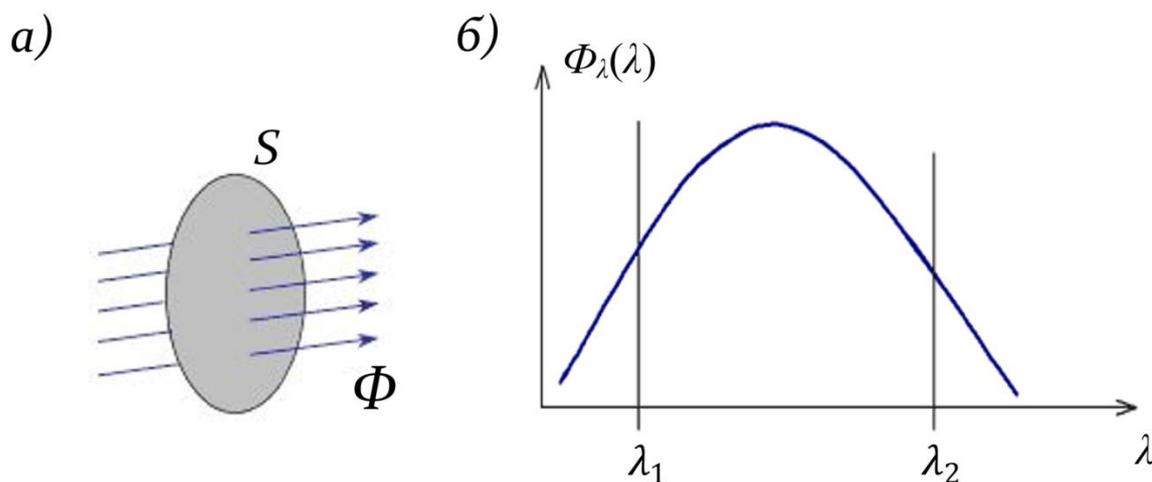


Рис. 10.1. Поток излучения (а) и кривая зависимости спектральной плотности потока излучения от длины волны (б) [6].

Φ – поток излучения; S – площадка; $\Phi_\lambda(\lambda)$ – спектральная плотность потока излучения; λ – длина волны.

10.2.2. Спектральная плотность потока излучения

Спектральная плотность потока излучения $\Phi_\lambda(\lambda)$ представляет собой функцию распределения энергии по спектру излучения (рис.10.1.б.), тогда общий суммарный поток для всех длин волн в диапазоне от λ_1 до λ_2 вычисляют как интеграл:

$$\Phi = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_\lambda(\lambda) d\lambda \quad (10.1)$$

10.2.3. Освещенность и сила излучения

Количественная оценка освещения той или иной поверхности характеризуется величиной, называемой освещенностью.

Освещенность E – поток, приходящийся на единицу площади поверхности:

$$E = \Phi/S \text{ [Вт/м}^2\text{]} \quad (10.2)$$

На рис. 10.2.а схематически представлено излучение точечного источника света в пределах некоторого телесного угла Ω . Телесный угол

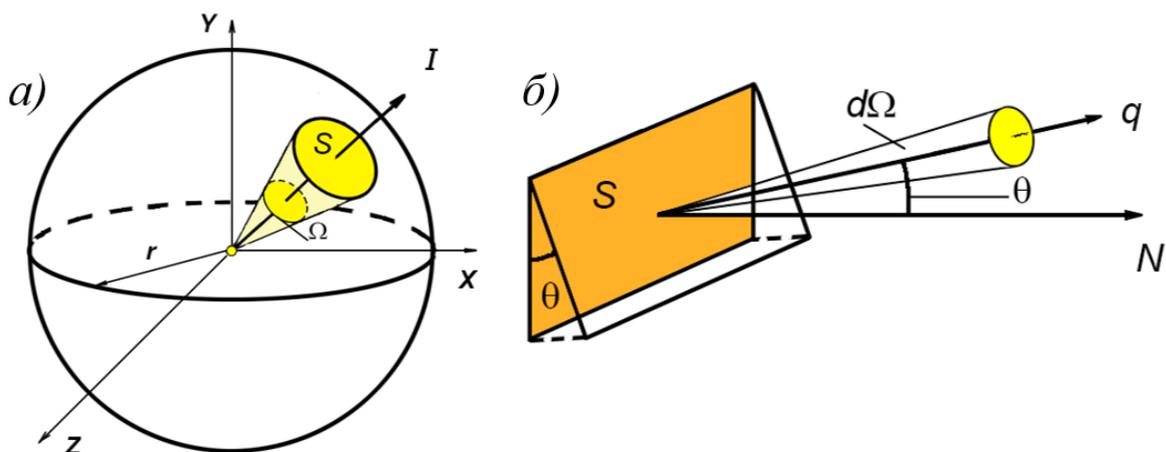


Рис. 10.2. Энергетическая сила света (а) и спектральная плотность потока излучения (б) [6].

I – сила излучения; S – площадка; Ω – телесный угол; θ – угол между направлением излучения q и нормалью N к площадке S протяженного источника света; $d\Omega$ – элементарный телесный угол.

данного конуса равен отношению площади S поверхности, вырезанной конусом на сфере, к квадрату радиуса r сферы:

$$\Omega = \frac{S}{r^2}, \text{ [ср]} \quad (10.3)$$

Телесный угол измеряется в стерадианах (в сфере 4π стерадиан).

Сила излучения (энергетическая сила света) I – это поток излучения, приходящийся на единицу телесного угла, в пределах которого он распространяется:

$$I = \frac{\Phi}{\Omega}, \left[\frac{\text{Вт}}{\text{ср}} \right] \quad (10.4)$$

За единицу энергетической силы света приняты сила излучения такого точечного источника, у которого в пределах 1 стерадиана равномерно распределяется поток излучения в 1 ватт. Энергетическая сила света – величина, имеющая направление. За направление силы света принимают ось телесного угла, в пределах которого распространяется

поток излучения. Сила излучения является характеристикой именно точечного источника [6].

10.2.4. Энергетическая яркость

Яркость определяет поверхностно-угловую плотность потока излучения. Яркость является характеристикой протяженного источника, в то время как сила излучения является характеристикой точечного источника.

Энергетическая яркость L (или просто *яркость*) – это величина потока, излучаемого единицей площади в единицу телесного угла в данном направлении. Если излучающая площадка dS перпендикулярна направлению излучения, то энергетическая яркость определяется следующим образом:

$$L = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \Omega \partial S}, \left[\frac{Вт}{ср м^2} \right] \quad (10.5)$$

За единицу энергетической яркости принимают яркость плоской поверхности в $1 м^2$, которая в перпендикулярном направлении имеет энергетическую силу света в $1 Вт/ср$.

Спектральная плотность энергетической яркости показывает распределение энергетической яркости по спектру:

$$L_\lambda = \frac{\partial L}{\partial \lambda} \quad (10.5)$$

10.3. Микроскоп как передатчик световой энергии

Рассмотрим оптическую схему микроскопа с точки зрения ее инвариантности (неизменности). Важность инвариантности обусловлена тем, что микроскоп используется как передатчик световой энергии для количественных измерений. Не влияет ли сама схема на величину потока? От каких параметров зависит величина потока, который доходит до фотоприемника? Сначала рассмотрим инвариант яркости вдоль луча.

10.3.1. Инвариант яркости вдоль луча

В однородной среде яркость вдоль луча сохраняется постоянной (инвариантной) при отсутствии потерь энергии: $L = const$. Если среда неоднородна (показатель преломления меняется), то используется *приведенная яркость (инвариант яркости)* [6]:

$$\frac{L}{n^2} = const \quad (10.6)$$

Из инварианта яркости следуют два важных для геометрической оптики следствия:

- яркость является основной характеристикой передачи световой энергии оптической системой;
- оптическая система в принципе не может увеличивать яркость проходящего через нее излучения (она может лишь уменьшить яркость за счет поглощения или рассеяния света) [6].

10.3.2. Инвариантность схемы микроскопа

Перейдем теперь к микроскопу. Диафрагмы и их изображения через оптические элементы микроскопа образуют канал, по которому «течет» поток энергии. Этот канал называют *световой трубкой*, основное свойство которой состоит в том, что ни один луч не выходит за ее пределы.

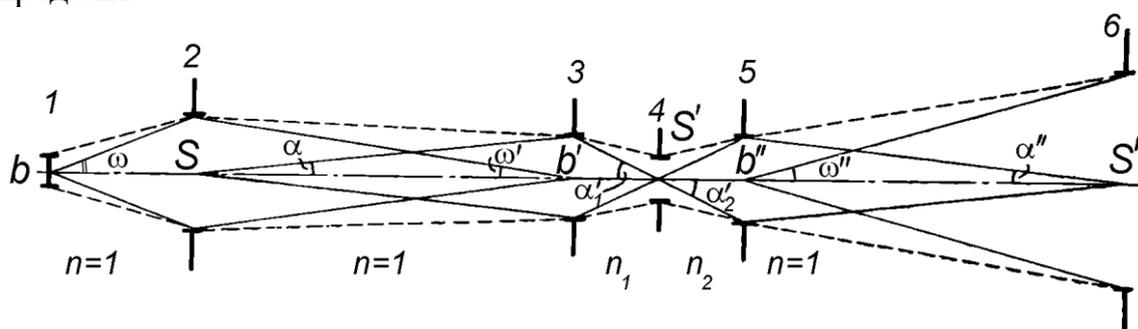


Рис. 10.3. Представление оптической системы микроскопа в виде световой трубки [7]. 1 – источник света; 2 – диафрагма коллектора; 3 – апертурная диафрагма конденсора; 4 – плоскость препарата; 5 – выходной зрачок объектива; 6 – плоскость изображения.

На рис. 10.3. оптическая система микроскопа представлена в виде световой трубки. В любом сечении такой трубки справедлив инвариант [7]:

$$Sn^2 \sin^2 \alpha = const, \quad (10.7)$$

где n – показатель преломления, S – площадку, ограниченная световой трубкой, α – угол между осью и образующей телесного угла, в пределах которого распространяется излучение, а вершина угла лежит в центре площадки S . Применительно к рис. 10.3. можно записать инвариант в виде:

$$\begin{aligned} a \sin^2 \omega &= S \sin^2 \alpha = a' \sin^2 \omega' = S' n_1^2 \sin^2 \alpha'_1 = \\ &= S' n_2^2 \sin^2 \alpha'_2 = a'' \sin^2 \omega'' = S'' \sin^2 \alpha'', \end{aligned} \quad (10.8)$$

где, n_1 и n_2 – показатели преломления иммерсии конденсора и объектива.

В любом сечении световой трубки поток сохраняется неизменным, если не учитывать его ослабления в результате поглощения, отражения или рассеяния внутри трубки. Для учета этих эффектов вводят коэффициент пропускания оптической системы микроскопа τ_m .

Сказанное о неизменности потока применительно к реальным приборам может вызвать недоумение, поскольку до фотоприемника

подчас доходит ничтожная часть излучения, направляемого в микроскоп. Необходимо, однако, учитывать, что световая трубка всегда определяется наименьшим инвариантом. Поэтому, например, если выражение для регистрируемого потока в микрофотометре представить в виде:

$$\Phi = \pi L S' A^2 \tau_m, \quad (10.9)$$

то под S' следует понимать фотометрируемый участок в плоскости препарата, а под A – числовую апертуру конденсора или объектива в зависимости от того, какая из них меньше.

Если измерения выполняются в монохроматическом свете, то формула для расчета монохроматического потока должна быть записана через спектральную яркость источника и ширину выделяемого спектрального интервала:

$$\Phi = \pi L_\lambda \Delta\lambda S' A^2 \tau_m \quad (10.10)$$

Из инвариантности схемы микроскопа (из представления ее в виде световой трубки) следует важное для количественных измерений следствие: при заданной апертуре осветительного пучка и заданном размере фотометрируемой площади увеличить поток можно, только повышая яркость источника и снижая потери света в оптике. Это особенно важно подчеркнуть, ибо неискушенные в оптике исследователи пытаются порой различными «оптическими» ухищрениями поднять световой сигнал [7].

10.4. Абсорбционный анализ

Абсорбционный спектральный анализ основан на исследованиях и измерениях поглощения света веществом. Спектр поглощения является индивидуальным и характерным свойством атомов и молекул вещества. По спектру удастся надежно установить как молекулярный состав, так и количественное содержание отдельных компонентов в смесях. Вид спектра удастся связать с химической структурой вещества, определить наличие в молекулах определенных связей.

Поглощение света – это потеря энергии световым пучком, проходящим через вещество, в результате ее превращения в различные формы внутренней энергии вещества или в энергию вторичного излучения иных направлений и спектрального состава. Потери энергии могут происходить также из-за *рассеяния света* (W_{pac}). Количество поглощенной энергии W_n экспериментально определяют как

$$W_n = W_0 - W_{pac} - W_{np}, \quad (10.11)$$

где W_0 – падающая на вещество энергия, W_{np} – энергия, прошедшая через среду [18].

10.4.1. Закон поглощения света

Метод количественного абсорбционного анализа основан на законе *Бугера-Ламберта-Бера*, который определяет постепенное ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающем веществе. Согласно этому закону, интенсивность света, прошедшего слой l , равна:

$$I(l) = I_0 e^{-\varepsilon cl}, \quad (10.12)$$

где I_0 – интенсивность света перед поглощающим слоем, $I(l)$ – интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной l , ε – показатель поглощения света на единицу концентрации C .

Экспериментально закон открыт в 1729 году французским ученым Бугером (Pierre Bouguer, 1698 – 1758), подробно рассмотрен в 1760 году Ламбертом (нем. Johann Heinrich Lambert, 1728 – 1777), а в 1852 году проверен на опыте в отношении концентрации Бером (нем. August Beer, 1825 – 1863).

Закон математически следует из предположения, что относительное ослабление света в бесконечно тонком слое не зависит от интенсивности света и пропорционально толщине слоя dl и концентрации C поглощающего вещества. С.И. Вавилов экспериментально показал, что закон справедлив в широких пределах изменения интенсивности света (примерно 10^{20} раз). Нарушение закона возможно лишь при чрезвычайно высоких освещенностях, имеющих место в лазерах [18].

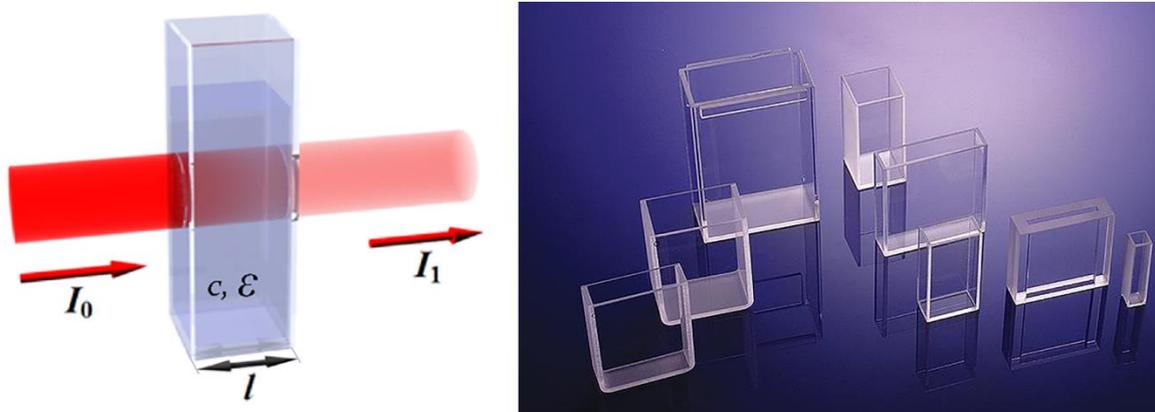


Рис. 10.4. Кюветы стандартной толщины, предназначенные для измерения поглощения жидкостей [39].

В абсорбционных спектрофотометрах толщина поглощающего слоя l определяется размерами стандартной кюветы. Регистрируемый сигнал сравнивают с сигналом эталонного образца известной концентрации.

10.4.2. Измерение поглощения на спектрофотометре

Спектрофотометр состоит из источника излучения 1, коллектора 2, монохроматора 3, приемника излучения 5 и отсчетного устройства 6 (рис. 10.5). Изучаемый образец 4 помещают между источником света и приемником [7].

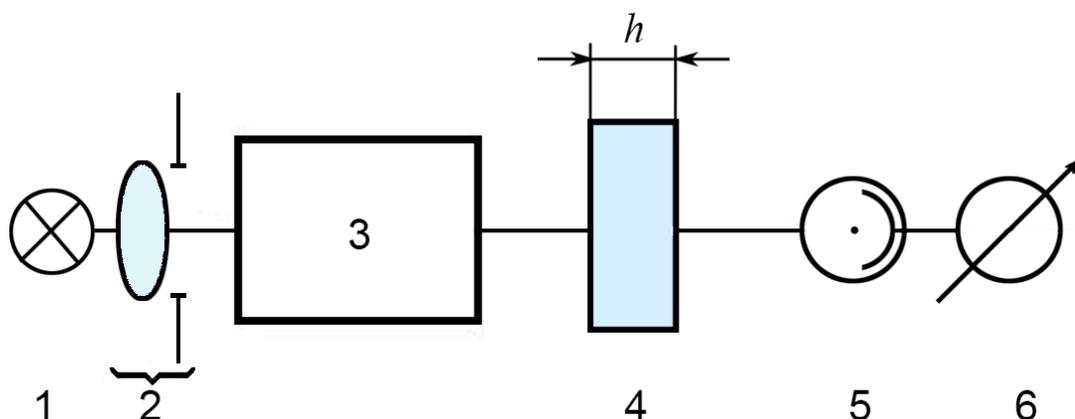


Рис. 10.5. Принципиальная схема устройства для измерения поглощения.

1 – источник света; 2 – коллектор, 3 – монохроматор; 4 – образец; 5 – приемник излучения; 6 – измерительный прибор; h – толщина слоя.

Часто спектр поглощения имеет вид колоколообразной кривой, характеризующейся положением максимума λ_{max} и *полушириной*, под которой понимают расстояние $\Delta\lambda$ в нм, соответствующее ширине полосы поглощения на уровне, равном половине максимального (рис. 10.6.). Реальный спектр поглощения, например, органических красителей, представляет собой, как правило, наложение нескольких полос.

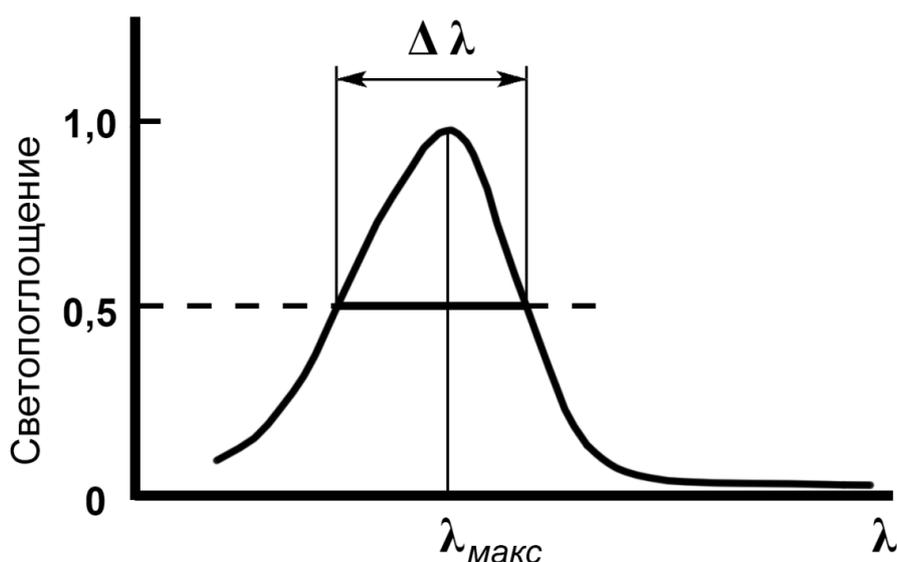


Рис. 10.6. Общий вид полосы поглощения.

Исследование таких спектров поглощения является основой качественного анализа, а измерение интенсивности полос поглощения – основой количественного анализа.

Количественные измерения пропускания образца производят сравнением сигналов приемника при попеременной установке в световой пучок образца и эталона. При измерениях поглощения жидкостей обычно пользуются двумя идентичными кюветами, одна из которых заполняется исследуемым образцом, а другая (пустая или наполненная растворителем) играет роль эталона [18].

10.5. Микроспектрофотометрия

Одно из первых устройств, состоящее из микроскопа и спектрального прибора, было создано К.А. Тимирязевым и продемонстрировано им на собрании Петербургского общества естествоиспытателей 29 января 1872 года. Открывшаяся возможность изучения физиологии отдельных клеток позволила Тимирязеву утверждать, что подобно тому, как сочетание спектроскопа с телескопом дало начало астрофизике, так и сочетание спектроскопа с микроскопом должно сыграть большую роль в исследовании живой материи.



Рис. 10.7. К.А. Тимирязев (1843 – 1920), естествоиспытатель, специалист по физиологии растений и исследователь фотосинтеза.

Однако методы микроспектрофотометрии обладают меньшей точностью и концентрационной чувствительностью по сравнению с методами спектрофотометрии, работающими обычно с растворами. Это объясняется сложностью биологического объекта, который в общем случае представляет собой структурированный коллоид, а также особенностью измерительной аппаратуры, включающей микроскоп [7].

10.5.1. Оптическая схема микроспектрофотометра

Микроспектрофотометр строится на общих принципах абсорбционной спектрофотометрии растворов, но имеет несколько существенных отличий:

1. Процесс фотометрирования связан с изображением объекта, а не с самим объектом.
2. В микроскопе объект, как правило, освещается конусом лучей, так как освещение параллельным пучком приведет к уменьшению разрешения. Однако закон Бугера-Ламберта-Бера определяет постепенное ослабление *параллельного* монохроматического пучка света при распространении его в кювете с поглощающим веществом, что осуществимо в спектрофотометре и невозможно выполнить в микроспектрофотометре.
3. В спектрофотометре пропускание исследуемого раствора в стандартной кювете сравнивают с пропусканием растворителя в подобной кювете. Сделать такие измерения с заменой исследуемого препарата на эталонный в микроспектрофотометре не представляется возможным либо весьма затруднительно осуществить без внесения ошибок.

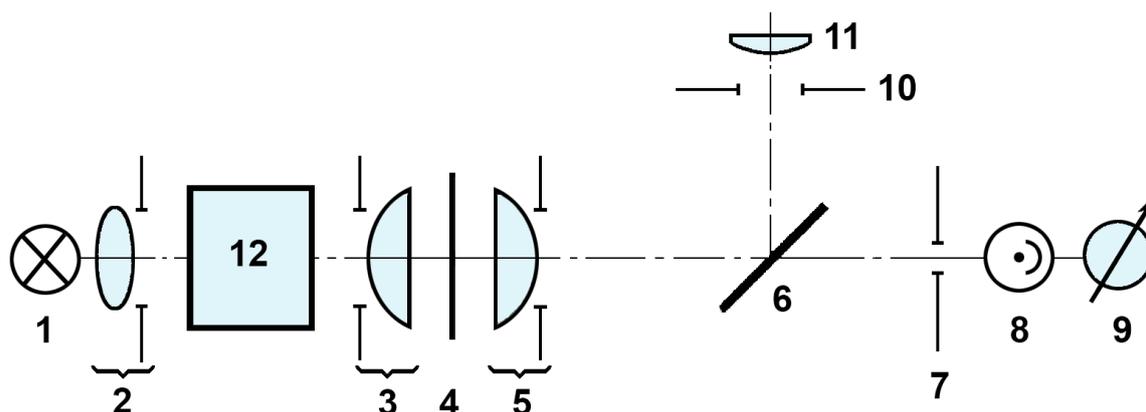


Рис. 10.8. Принципиальная схема микроспектрофотометра для измерения поглощения.

1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – откидное зеркало; 7 – фотометрическая диафрагма; 8 – приемник излучения; 9 – измерительный прибор; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – линза окуляра; 12 – монохроматор.

Простейший способ превращения традиционного микроскопа проходящего света в фотометрический прибор состоит в том, что вместо фотонасадки (см. гл. 9) в плоскости изображения устанавливают непрозрачный экран с отверстием 7 (рис. 10.8.), за которым помещают приемник излучения 8 и измерительный прибор 9. Непрозрачный экран с отверстием представляет собой фотометрическую диафрагму. На приемник попадает излучение от той части изображения объекта, которую совмещают с отверстием. Однако для предварительной настройки микроскопа, поиска исследуемой структуры на препарате и совмещения ее изображения с фотометрической диафрагмой необходимо в схему прибора ввести визуальное устройство, состоящее из откидного зеркала 6 и окуляра 11, в полевую диафрагму 10 которого вставлена пластинка с перекрестием. Рассмотрим изображение в окуляре 11 и соответствующий этому изображению вид фотометрической диафрагмы 7 со стороны приемника 8.

Порядок измерений происходит следующим образом: сначала оператор настраивает освещение по Кёлеру и наблюдает изображение объекта на фоне перекрестия (рис. 10.9.а.). Выбрав структуру, он совмещает ее с центром перекрестия (в), что соответствует совмещению этой структуры с фотометрической диафрагмой (з), и производит первый отсчет измерительного прибора.

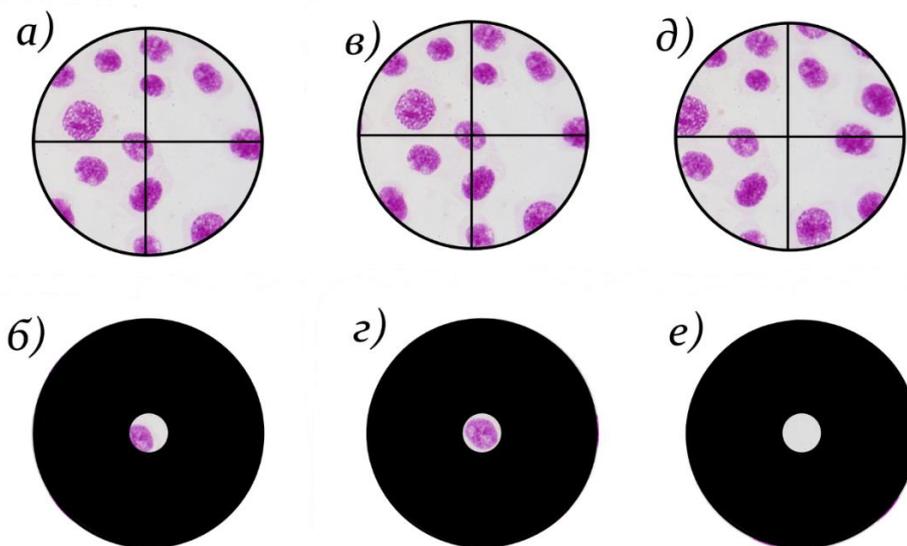


Рис. 10.9. Изображения объекта, наблюдаемые в окуляре (а, в, д), и за фотометрической диафрагмой (б, з, е) со стороны приемника излучения.

После этого оператор сдвигает препарат и устанавливает в центре перекрестия «пустое место» (д) рядом со структурой. «Пустое место» совмещается с диафрагмой (е), и оператор производит второй отсчет. По этим двум отсчетам рассчитывают пропускание структуры относительно среды, в которой она находится.

Надо понимать, что на рис. 10.8. представлена очень упрощенная схема прибора. Надежность измерений зависит от точности совмещения центров перекрестия и фотометрической диафрагмы и от того, насколько долго сохраняется это условие при многократном переключении зеркала б, т.е. от жесткости конструкции прибора.

Ошибки могут возникать из-за того, что оператор не видит, насколько точно изображение структуры вписалось в отверстие диафрагмы. Кроме того, если структура имеет сложную форму, то форма и размер фотометрической диафрагмы должны ей соответствовать, что достаточно трудно осуществить на практике. Иными словами, у этой схемы два существенных недостатка: а) исследователь не видит фотометрической диафрагмы и б) не может контролировать разъюстировку прибора при многократных переключениях зеркала б. На рис. 10.10. представлены возможные схемы устранения некоторых из этих недостатков.

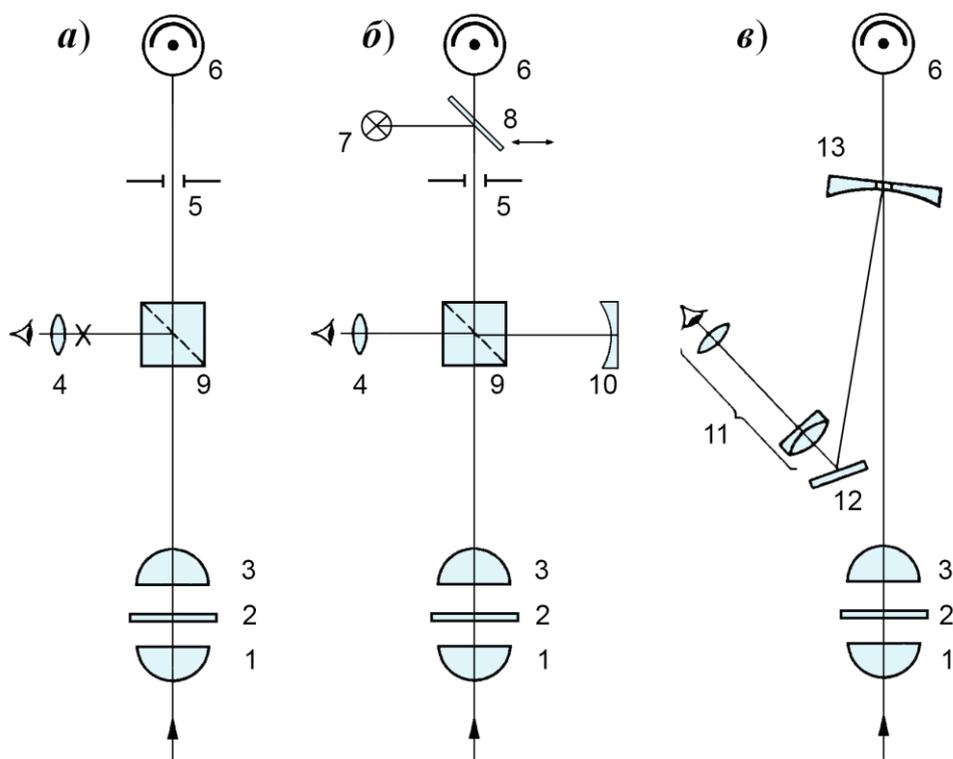


Рис. 10.10. Различные схемы систем наблюдения [7].

1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – окуляр; 5 – фотометрическая диафрагма; 6 – приемник излучения; 7 – осветитель; 8 – откидное зеркало; 9 – светоделительный кубик; 10 – сферическое зеркало; 11 – вспомогательный микроскоп; 12 – поворотное плоское зеркало; 13 – вогнутое зеркало с отверстием в отражающем слое.

Схема (а) не имеет отключающихся (подвижных) оптических деталей и потому отличается большей жесткостью. В ней откидное зеркало заменено неподвижным светоделительным кубиком 9. Однако

сохраняется недостаток, связанный с тем, что оператор не видит фотометрической диафрагмы 5.

В схеме (б) между фотометрической диафрагмой 5 и приемником 6 дополнительно размещены осветитель 7 и выключающееся зеркало 8. В результате отверстие фотометрической диафрагмы оказывается освещенным. В окуляре 4 (с помощью светоделительного кубика 9 и сферического зеркала 10) оператор видит изображение отверстия одновременно с изображением препарата. При измерении зеркало 8 выводят из хода лучей, а осветитель 7 выключают.

В схеме (в) вместо непрозрачной диафрагмы установлено вогнутое сферическое зеркало 13, в центре которого снят отражающий слой. Такое зеркало не только выделяет измеряемую структуру, но и передает изображение объекта наблюдателю. С помощью вспомогательного микроскопа 11, сфокусированного на зеркало, наблюдатель видит увеличенное изображение объекта на зеркале 13 и на его фоне фотометрическую диафрагму в виде темного кружка. При такой конструкции фотометрируют тот участок объекта, изображение которого попадает в пределы диафрагмы. Жесткая связь наблюдаемого и измеряемого участков поля обеспечивает независимость от случайных смещений оптических элементов схемы.

Встречаются и другие конструктивные решения оптической схемы, но главным остается обеспечение надежности и воспроизводимости измерений.

10.5.2. Световая трубка и условие фотометрирования

Рассмотрим условие, при котором мы вправе проводить измерения пропускания, выделяя фотометрической диафрагмой изображение объекта. Схему микроскопа рассматривают в виде световой трубки (см. п. 10.3.2). По условию инвариантности в любом ее сечении световой поток сохраняется неизменным, если не происходит его ослабления из-за поглощения, отражения или рассеяния внутри трубки (при отсутствии объекта). Из этого следует, что для регистрации поглощения объекта в оптической системе необходимо максимально снизить потери энергии, связанные с рассеянием, отражением и поглощением в самом приборе.

10.5.3. Влияние рассеянного света

Рассеянный свет является одним из основных источников ошибок при измерениях. Рассеянные лучи попадают на приемник в обход измеряемой структуры и повышают сигнал по сравнению с истинным. Например, если измеряемая структура полностью поглощает свет (пропускание $\tau = 0$), то из-за рассеянного света измерительный прибор регистрирует $\tau > 0$. Это явление называют эффектом Шварцшильда-

Виллигера по именам авторов, описавших в 1906 году аналогичную ошибку, замеченную ими при фотометрировании края изображения солнечного диска [7].

Возникновение нерегулярных лучей (паразитной засветки) происходит в результате многократного отражения на границах стекло-воздух, рассеяния на пылинках и неоднородностях оптических деталей, на их оправках, в предметном и покровном стеклах, а также в самом препарате.

10.5.4. Влияние размера освещаемого поля и соотношение апертур

Рассеянные и нерегулярные лучи создают паразитную засветку плоскости изображения. Поэтому целесообразно уменьшить размер освещаемого поля на препарате до размера исследуемой структуры. Необходимость строгого ограничения освещаемой площади требует обращать особое внимание на качество конденсора, который должен создавать безабберационное изображение полевой диафрагмы на темном фоне. В противном случае рассеянные конденсором лучи будут приводить к нерегулярной засветке поля, что становится особенно заметным при малых освещаемых полях. Надо отметить, что изменение диаметра фотометрической диафрагмы перед приемником практически не влияет на величину засветки.

Влияние апертуры осветительной системы на уровень паразитной засветки значительно меньше, чем влияние размера освещенного поля. Тем не менее, апертуру конденсора следует ограничивать до 0,6 даже при работе с высокоапертурными объективами. Особенно резкое возрастание засветки наблюдают при апертуре конденсора, превышающей апертуру объектива.

Основным способом снижения бликов от линз в объективе является просветление оптики. Немалое значение имеет также чистота стеклянных поверхностей во всей оптической схеме микроскопа, включая предметное и покровное стекла. Применение иммерсионных объективов позволяет уменьшить отражение от фронтальной линзы объектива и покровного стекла, а также исключить влияние дефектов поверхности покровного стекла [7].

10.6. Подготовка препарата

Подготовка препарата с целью его фотометрирования требует высокой квалификации экспериментатора для получения надежных результатов и правильного их толкования. При измерениях предполагают, что световой пучок ослабляется исключительно за счет поглощения измеряемой структуры.

Обычно объект (например, каплю раствора или биологическую клетку) заключают между предметным и покровным стеклами (рис. 10.11.). В результате свет проходит, как минимум, четыре границы. Если показатели преломления стекла и объекта достаточно близки, тогда главную роль в ослаблении пучка, кроме поглощения, играют отражения и рассеяния на границах стекло-воздух, объект-воздух, поэтому объект заключают в среду с близким к стеклу и объекту показателем преломления.

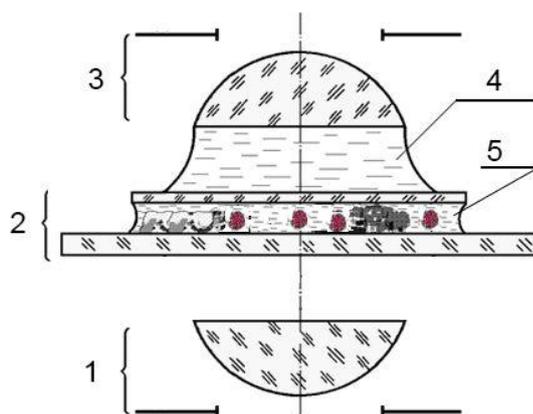


Рис. 10.11. Система конденсор-препарат-объектив для регистрации поглощения. 1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – иммерсия объектива; 5 – иммерсия.

Препарат, предназначенный для количественных измерений, желательно подготовить таким образом, чтобы исследуемые структуры не соприкасались друг с другом, а «пустое место» рядом с ними было свободно от красителя и посторонних элементов. Примером подготовки такого препарата может служить изображение окрашенных ядер клеток проросших зерен ячменя (рис. 10.12.а.). Окрашенные ядра клеток пыльцы лилии, представленные на рис. 10.12.б., окружены неоднородными структурами клеток, затрудняющими выбор «пустого места» для измерения поглощения ядер.

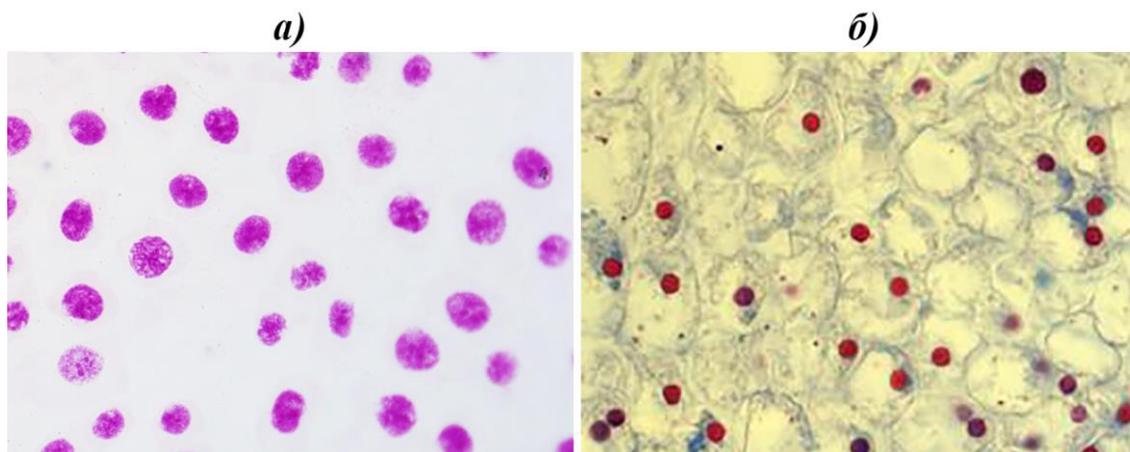


Рис. 10.12. Окрашенные ядра растительных клеток. а) ядра проросших семян ячменя; б) клетки пыльцы лилии.

Влияние внефокусных частиц. В относительно толстом препарате всегда присутствуют частицы, лежащие выше или ниже плоскости фокусировки. Такие частицы могут быть совершенно не видны в окуляре, однако они поглощают свет и вносят вклад в ослабление пучка. Проблема внефокусных частиц снижается, если толщина объекта не превышает глубины резкости объектива и составляет, например 0,3 – 0,8 мкм.

Применение микроспектрофотометров при исследовании растворов целесообразно только для анализа малых объемов поглощающего вещества, например, при его остром дефиците, а также для измерения высоких концентраций в тонком слое. В остальных случаях предпочтительней проводить измерения растворов в кюветах на спектрофотометре.

При исследовании практически фазовых объектов, например, внутриклеточных структур, биологический материал подвергают количественному (дифференциальному) окрашиванию. В этом случае краситель выступает в роли посредника. Он химически связывается с определенной молекулярной структурой, и по его поглощению определяют количество исследуемого вещества. Для этого необходимо выполнить следующие условия:

- 1) краситель должен быть специфичным, т.е. окрашивать только те соединения, которые подлежат анализу;
- 2) реакция должна быть количественной, т.е. концентрация конечного продукта реакции должна быть пропорциональна концентрации исследуемого вещества;
- 3) окрашенный конечный продукт должен подчиняться закону поглощения;
- 4) при измерениях производить выборку неповрежденных объектов, а затем подвергать данные статистической обработке и оценке погрешности.

Каждый этап в жизни клетки сопровождается определенными количественными превращениями внутриклеточных веществ. Вследствие этого даже в пределах одного препарата наблюдается разброс клеток по изучаемым параметрам. Только статистическая обработка результатов измерений может дать некоторое среднее число, характеризующее группу контрольных или опытных объектов. Статистический разброс измерений зависит как от подготовки препарата, так и от ошибок, связанных с прибором [7].

10.7. Ошибка распределения

Напоминаем, что закон Бугера-Ламберта-Бера справедлив для однородных поглощающих слоев, на которые падает параллельный пучок монохроматического излучения. В микроспектрофотометрии очень часто

в пределах фотометрической диафрагмы поглощающее вещество распределяется не равномерно, а в виде структур, различающихся размером и формой. Неравномерное распределение приводит к тому, что прошедший через поглощающее вещество световой поток оказывается больше потока, который проходит через такое же количество вещества, но при его равномерном распределении. В результате возникает ошибка, названная *ошибкой распределения*. Эта ошибка возникает в расчетах при использовании в них результатов измерения, справедливых лишь при равномерном распределении поглощающего вещества.

На рис. 10.13. представлена модель, иллюстрирующая возникновение ошибки распределения. Модель представляет собой сечение кюветы вдоль пучка света.

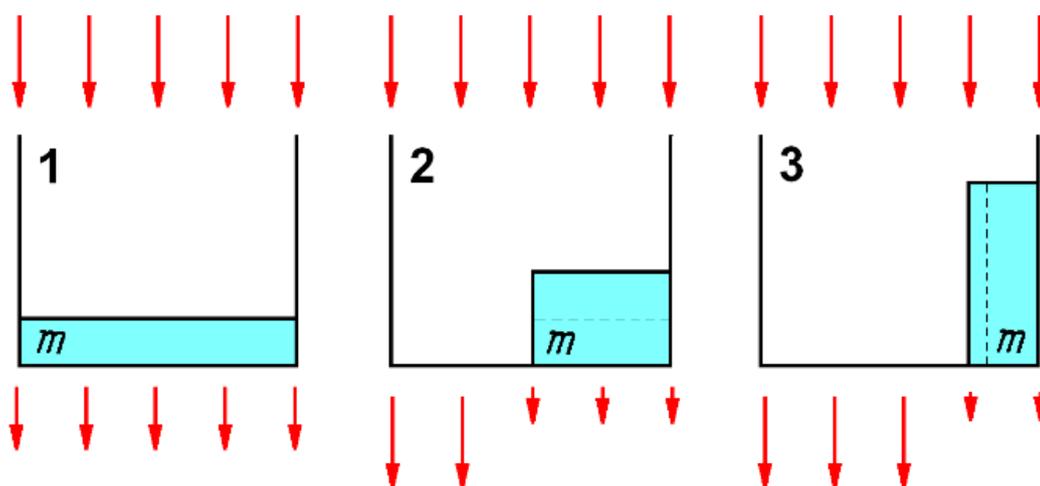


Рис. 10.13. Модель, иллюстрирующая ошибку распределения при различной компоновке поглощающего вещества в пределах фотометрирования. m – масса вещества; 1, 2 и 3 – варианты компоновки.

Пусть равное количество поглощающего вещества массой m находится в каждой из трех кювет, но с различной его компоновкой. При этом объем, занимаемый веществом, остается постоянным (площадь прямоугольников сохраняется неизменной). Пусть при равномерном распределении вещества (кювета 1) световой поток ослабляется в два раза, тогда пропускание $\tau_1 = 0,5$, а плотность $D_1 = 0,3$. Расчеты показывают, что в кювете 2 плотность оказывается равной $D_2 = 0,2$, а в кювете 3 – $D_3 = 0,12$. Ошибка распределения в трех кюветах составляет 0%, 33% и 60%, соответственно. В результате такой перекомпоновки вещества общее пропускание увеличивается, а оптическая плотность соответственно уменьшается, т.е. по мере перекомпоновки вещества измеряемая величина все больше отличается от истинной [7].

Ошибка распределения зависит не только от характера распределения вещества в поле фотометрирования, но и от абсолютного значения оптической плотности: ошибка возрастает с увеличением

локальной плотности, но при малой плотности ($D < 0,05$) она не превышает 5% даже в случае крайне неравномерного распределения.

Конечно, прямоугольная модель, поясняющая ошибку распределения, далека от сложного распределения вещества в препаратах. Однако закономерности, представленные на моделях, носят общий характер и объясняются экспоненциальной зависимостью ослабления света веществом. Ошибку распределения также можно рассматривать как результат различной степени взаимного экранирования молекул в пределах площади фотометрирования. Кроме того, неоднородность поглощения может быть обусловлена как колебаниями толщины объекта, так и изменениями концентрации. Ошибка распределения искажает спектр поглощения: большие плотности занижаются сильнее, чем малые. В результате кривая спектра поглощения «оседает и уплотняется».

Ошибка распределения встречается и в спектрофотометрии, например при исследовании суспензий в кюветах. Кроме того, повышенная сходимость светового пучка и непараллельность окон кюветы также вызывают ошибку такого рода. Поэтому борьба с ошибкой распределения имеет общее значение для спектрофотометрии.

10.8. Метод сканирования

Сканирование как метод уменьшения ошибки распределения был предложен в 1940-х годах шведским биофизиком Т. Касперсоном (1910 – 1997). В те года метод не получил распространения из-за отсутствия технической базы. Интерес к методу сканирования вновь появился благодаря успехам автоматике и вычислительной техники. Оптическая промышленность начала выпускать сканирующие микроскопы, а теория и методика сканирования получили дальнейшее развитие. Таким образом, сканирование превратилось в один из основных измерительных приемов микрофотометрии.

10.8.1. Принцип метода

Принцип метода сканирования состоит в систематическом фотометрировании множества предельно малых участков объекта с последующим интегрированием результатов измерений по всей анализируемой площади. При этом либо перемещается зонд относительно неподвижного препарата, либо препарат относительно неподвижного зонда.

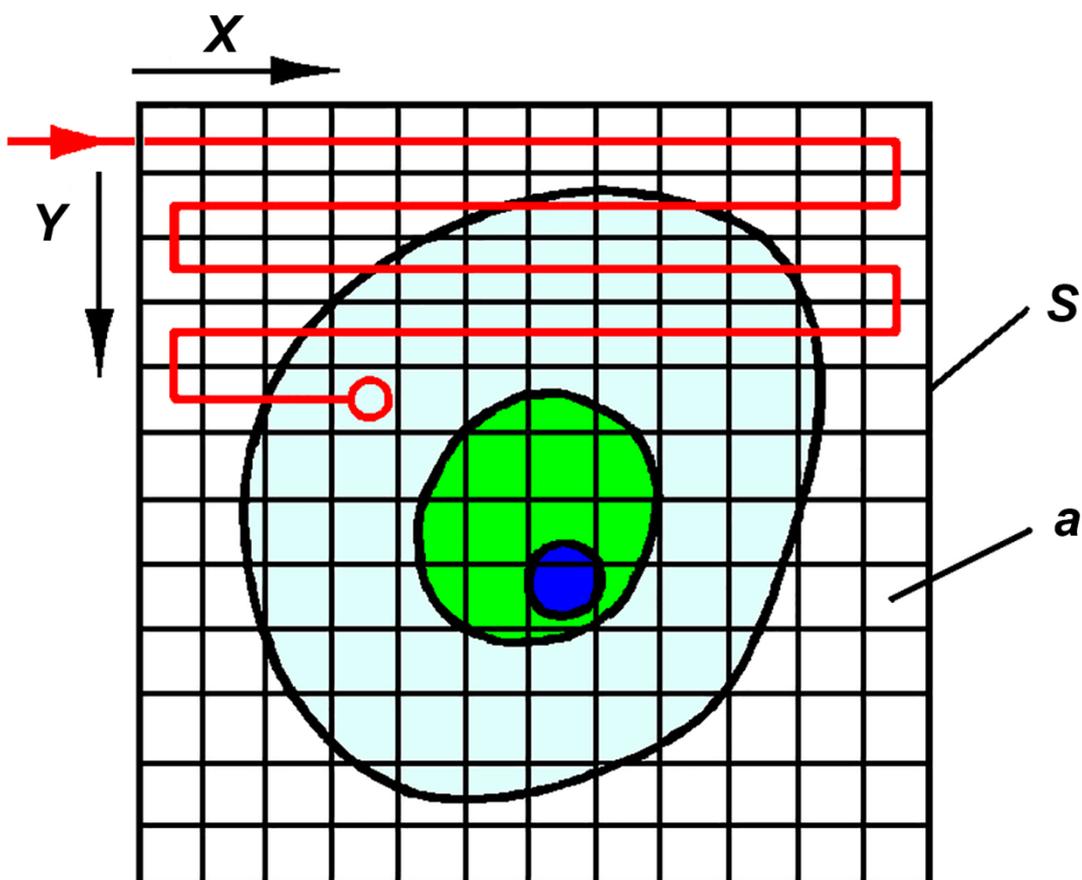


Рис. 10.14. Зонд (красный) перемещается по полю зрения, последовательно попадая в каждый малый элемент a площади S [7].

В общем случае измерительный цикл состоит из двух сканирований: поля с объектом и соседнего свободного участка препарата. Шаг сканирования определяется расстоянием, пройденным зондом за интервал времени между последовательными отсчетами регистрирующего прибора. Если размер зонда мал, то распределение вещества в пределах a можно считать равномерным. Количество вещества определяют суммированием элементарных масс.

10.8.2. Сканирующие устройства

Сканирующие устройства различаются по принципу действия, конструкции, по месту расположения в приборе и осуществляют:

- перемещение препарата относительно неподвижных фотометрической и осветительной диафрагм;
- перемещение изображения относительно неподвижной фотометрической диафрагмы;
- перемещение фотометрической диафрагмы относительно неподвижного изображения;

- перемещение осветительного зонда относительно неподвижного препарата (бегущий луч).

На рис. 10.15. изображены три типа сканирующих устройств и их расположение в схеме прибора.

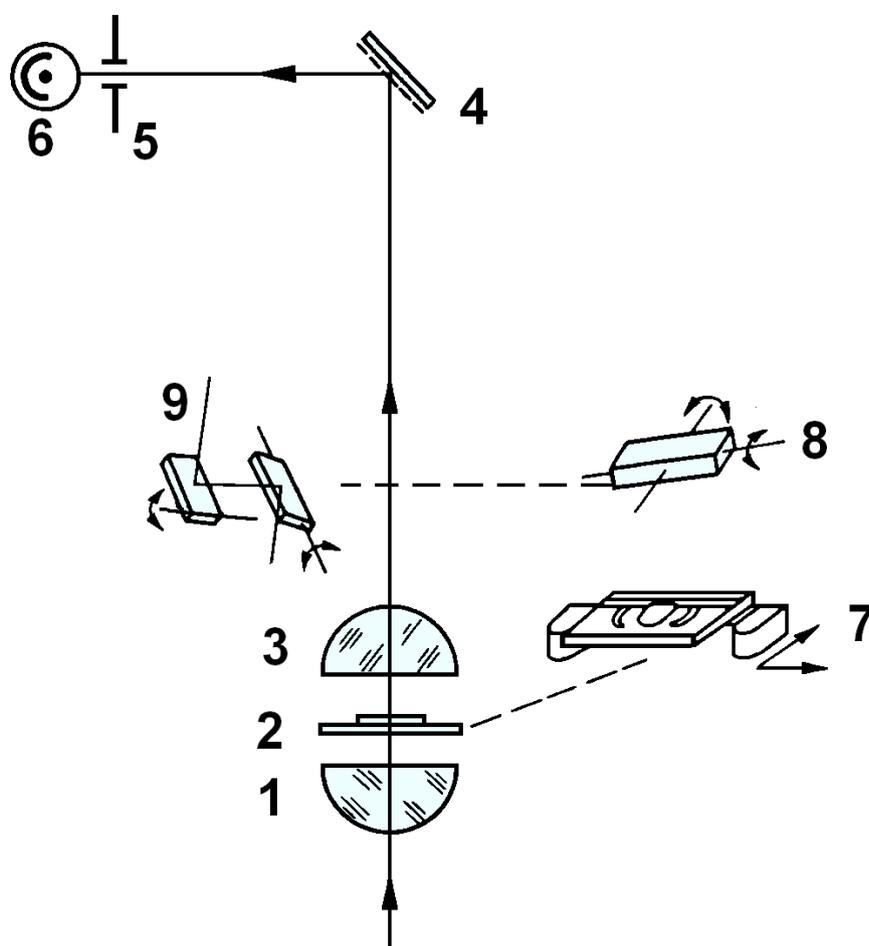


Рис. 10.15. Типы сканирующих устройств и их расположение в оптической схеме микроскопа [7].

1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – поворотное зеркало (или светоделительная пластинка); 5 – фотометрическая диафрагма; 6 – приемник излучения; 7 - сканирующий столик; 8, 9 – сканирующие пластинки (сканеры).

Сканирующий столик. Наиболее распространенным механическим сканирующим устройством является специальный столик микроскопа 7, который перемещает препарат по двум взаимно-перпендикулярным направлениям. При использовании такого столика любой микрофотометр может быть превращен в сканирующий без вмешательства в оптическую схему. Сканирующий столик, перемещающий препарат, имеет следующие достоинства:

- измеряемый элемент на препарате всегда расположен на оптической оси микроскопа, а объектив при этом создает его изображение с минимальными aberrациями (точка на оси любого

объектива изображается с минимальными aberrациями для этого объектива);

- не требует равномерного освещения по всему полю сканирования;
- размер и форма фотометрической диафрагмы сохраняются неизменными в процессе измерения;
- имеет возможность изменения режимов сканирования.

Основные недостатки сканирующего столика – высокие требования к точности изготовления механических узлов, высокая чувствительность к вибрациям привода, относительно низкие скорости сканирования, связанные с необходимостью перемещения больших масс.



Рис. 10.16. Сканирующий столик с двумя шаговыми двигателями [40].

Двухкоординатный сканирующий столик устанавливают на кронштейне вместо обычного столика микроскопа (рис.10.16.). Смещение препарата происходит с помощью двух шаговых двигателей, установленных на столике. Столик обладает определенными пределами перемещений, например $25 \times 75 \text{ мм}^2$ с минимальным шагом $0,5 \text{ мкм}$. При сканировании по координате Y происходит смещение платформы с двигателями, а по координате X – смещение только препаратоводителя, что приводит к неодинаковой нагрузке при перемещении по разным направлениям. Управление двигателями производят по заданной программе. Скорость сканирования можно изменять, например, от 50 до 250 шагов в секунду, а величину шага – от $0,5$ до 6 мкм . Программа обеспечивает несколько типов сканирования: линейное, по меандру (как показано на рис. 10.14.), по заданному контуру и др. Контур задают для ограничения измеряемого поля перед началом основного сканирования.

Сканирующие пластинки (сканаторы). Сканирующие пластинки предназначены для регулярного смещения изображения объекта относительно фотометрической диафрагмы. Это смещение осуществляют, например, с помощью одной стеклянной пластинки 8 или

двух стеклянных пластинок 9, качающихся вокруг двух взаимно-перпендикулярных осей (рис. 10.15.). Преимущество таких систем – их относительно малый вес. Кроме того, если использовать, например 100-кратный объектив, то смещению препарата на 1 мкм соответствует смещение изображения на 100 мкм, что уменьшает требования к сканирующей системе. Общий недостаток систем с разверткой изображения – чувствительность к неравномерности освещения поля и необходимость вмешательства в оптическую схему микроскопа.

Ограничения измеряемого поля. При измерениях желательно, чтобы в пределах фотометрируемого поля находился только исследуемый объект без фрагментов от соседних объектов и их структур. Это особенно касается измерений тесно соприкасающихся объектов, например клеток в срезе. Существуют различные способы предварительного ограничения поля. В приборах со сканирующим столиком ограничение поля достигают выбором числа шагов и строк с помощью программы обхода по контуру, что позволяет перед началом измерения выделить объект сканирования. В тех случаях, когда измерения выполняют на объектах неправильной формы, расположенных в окружении поглощающих тканей, используют более сложные системы ограничения поля произвольной формы [7].

10.9. Приемники излучения

Фотоприемник предназначен для преобразования светового излучения в электрические сигналы. Из существующих приемников излучения в микрофотометрии в основном применяют фотоэлектронные умножители, фотодиоды и фотодиодные линейки.

10.9.1. Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ)

ФЭУ предназначен для измерения слабого излучения в определенной области спектра. Принцип работы ФЭУ основан на двух физических явлениях:

- внешнего фотоэффекта – испускание электронов веществом под действием света;
- вторичной электронной эмиссии – первичный электрон выбивает из материала несколько вторичных электронов.

Благодаря внешнему фотоэффекту происходит преобразование лучистой энергии в электрическую, а благодаря вторичной электронной эмиссии – усиление фототока. На рис. 10.17 представлена схема ФЭУ, поясняющая принцип его работы [7].

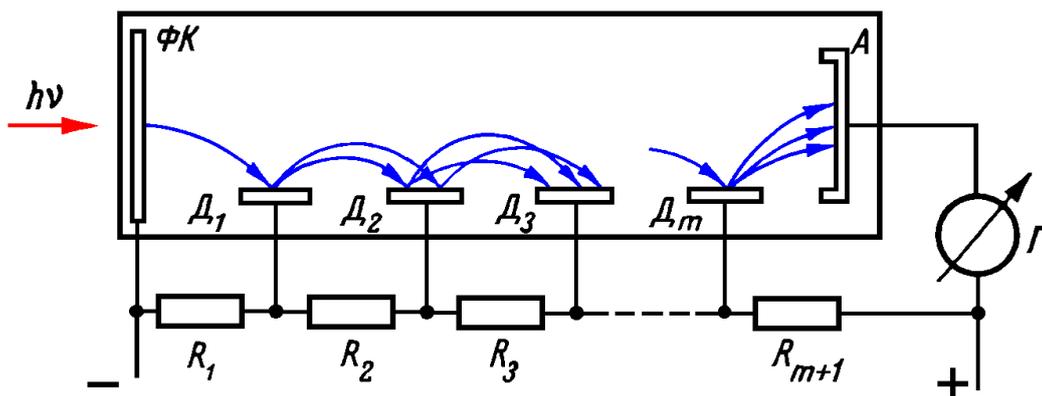


Рис. 10.17. Схема фотоэлектронного умножителя [7].

ΦK – фотокатод; $D_1 \div D_m$ – диноды; A – анод; $R_1 \div R_{m+1}$ – сопротивления делителя; Γ – гальванометр.

Конструкция ФЭУ содержит фотокатод ΦK , динодную систему $D_1 \div D_m$ и анод A . Все элементы размещаются в вакуумном баллоне. Для фокусировки и ускорения электронов на анод и диноды подается высокое напряжение в пределах 600–3000 вольт. Благодаря внешнему фотоэффекту происходит преобразование лучистой энергии в электрическую, а благодаря вторичной электронной эмиссии – усиление фототока. На рис. 10.17 представлена схема ФЭУ, поясняющая принцип его работы [7]. В паспорте фотоумножителя указывают спектральную характеристику и коэффициент усиления. Спектральная характеристика зависит от материалов фоточувствительного слоя и окна. Коэффициент усиления зависит от питающего напряжения. Эти характеристики учитывают при согласовании его с измерительным устройством. Выходной сигнал ФЭУ чувствителен к изменению напряжения питания.

На рис. 10.18. представлен внешний вид одного из типов фотоэлектронного умножителя, в центральной части вакуумного баллона которого виден каскад динодов.



Рис. 10.18. Фотоэлектронный умножитель, модель ФЭУ-29 [4].

Основные параметры ФЭУ:

- *световая анодная чувствительность* – отношение анодного фототока к вызывающему его световому потоку при номинальных потенциалах электродов (составляет $1 - 10^4$ А/лм);
- *спектральная чувствительность* – произведение спектральной чувствительности фотокатода на коэффициент усиления (обычно в пределах $10^3 - 10^8$ до 10^{11});
- *темновой ток* – ток в анодной цепи в отсутствие светового потока (обычно не превышает $10^{-9} - 10^{-10}$ А). Уменьшение темнового тока возможно за счет охлаждения фотокатода.

Помехи при работе ФЭУ. Чувствительность, точность и быстродействие микрофотометров в значительной степени зависят от различных помех, связанных с работой приемника: шума ФЭУ, его темнового тока, фоновой засветки и т.п.

- Под *шумом* ФЭУ понимают беспорядочные отклонения показаний прибора вокруг некоторого среднего значения. Случайный характер эмиссии приводит к тому, что за один и тот же промежуток времени фотокатод покидает различное число электронов. Величину шума оценивают отношением уровня сигнала к уровню шума (*сигнал/шум*). Чем больше это отношение, тем точнее может быть измерен сигнал. Для повышения отношения *сигнал/шум* необходимо увеличивать яркость источника, уменьшать потери в оптике, подбирать ФЭУ с оптимальными параметрами и увеличивать время накопления сигнала.
- Помехи вносит *фоновая* (посторонняя) *засветка* фотокатода. Для ее устранения необходимо предотвращать попадание на фотокатод рассеянного света в приборе и света из помещения, в котором находится прибор, или работать в затемненном помещении.

Системы регистрации сигнала включают усилители, функциональные преобразователи, интеграторы, регистрирующие и вычислительные устройства и другие средства измерительной техники.

Основная задача системы регистрации заключается в усилении и регистрации фототока, которую осуществляют тремя принципиально различными способами: измерением постоянной составляющей сигнала (*а*), переменной составляющей модулированного сигнала (*б*) или счетом одноэлектронных импульсов (*в*) (рис. 10.19.). При работе на постоянном токе измерительный прибор может подключаться либо непосредственно к аноду ФЭУ, либо через усилитель 4, когда величина тока недостаточна для прямого измерения.

При низком уровне сигнала в микрофотометрии предпочтительней применять метод счета одноэлектронных импульсов, который иногда называют «методом счета фотонов». Представленные схемы регистрации

используются в однолучевых микрофотометрах. Основной недостаток этих систем регистрации – зависимость отсчетов от колебаний яркости лампы. Для устранения этого недостатка в приборе применяют двухлучевую схему, в которой часть света лампы направляют на объект, а часть – вне объекта для регистрации отношения соответствующих потоков с помощью одного и того же ФЭУ или второго дополнительного приемника.

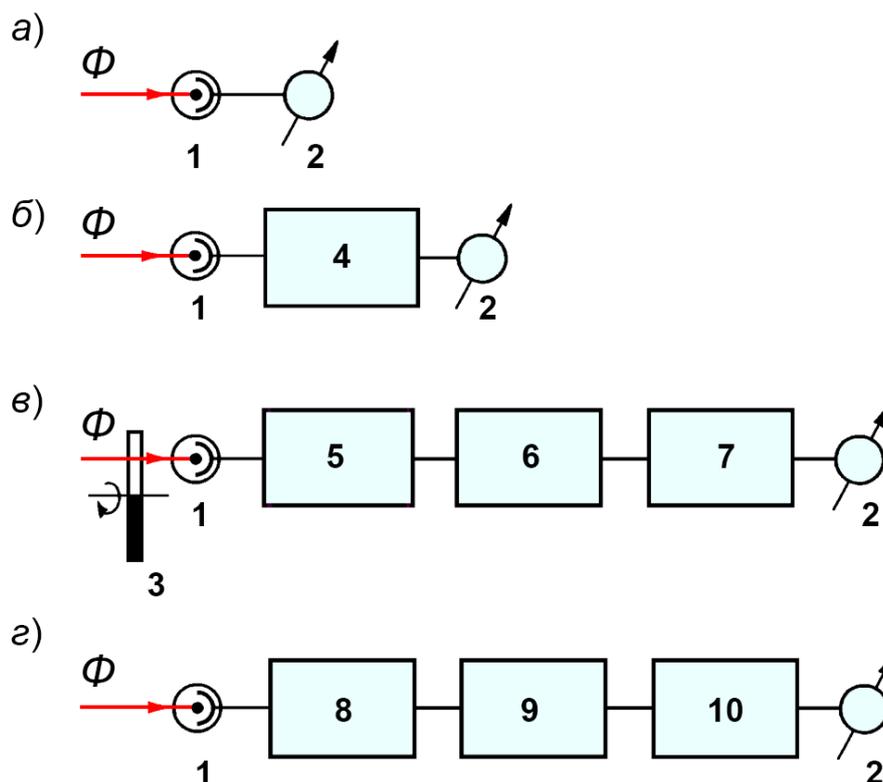


Рис. 10.19. Регистрация потока излучения Φ с помощью фотоумножителя и схемы обработки сигнала: на постоянном токе (а, б), на переменном токе (в) и методом счета импульсов (г) [7].

1 – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ); 2 – измерительный прибор; 3 – модулятор; 4 – усилитель постоянного тока; 5 – усилитель переменного тока; 6 – детектор; 7 – фильтр; 8 – широкополосный усилитель; 9 – дискриминатор; 10 – счетчик импульсов.

На величину сигнала ФЭУ оказывают влияние:

- изменение напряжения питания ФЭУ (ΔV); например, изменение напряжения на ΔV приводит к изменению анодного тока на $(10 \div 15) \Delta V$;
- электростатические и магнитные поля;
- нестабильность работы ФЭУ в течение длительного промежутка времени при неизменных внешних условиях (обычно проявляется в медленном изменении сигнала на выходе, чаще всего в его падении).

10.9.2. Фотодиод и фотодиодная линейка

Фотодиод – приемник излучения, фоточувствительная область которого преобразует свет в электрический заряд за счёт процессов в p - n -переходе. Работа фотодиода основана на эффекте разделения электронов и дырок в p - и n -области, за счет чего образуется заряд. Такие фотодиоды называются солнечным элементом. Кроме p - n фотодиодов, существуют и p - i - n фотодиоды, в которых между слоями p и n находится слой нелегированного полупроводника i . Фотодиоды p - n - и p - i - n преобразуют свет в электрический ток, но не усиливают его, в отличие от лавинных фотодиодов и фототранзисторов [4]. Фотодиод может работать в двух режимах:

- фотогальванический – без внешнего напряжения;
- фотодиодный – с внешним обратным напряжением.

К основным особенностям фотодиода относятся:

- простота технологии изготовления и структуры;
- сочетание высокой фоточувствительности и быстродействия;
- малое сопротивление базы;
- малая инерционность.

Лавинные фотодиоды (ЛФД) – высокочувствительные полупроводниковые приемники, преобразующие свет в электрический сигнал за счет фотоэффекта. Они могут обеспечивать внутреннее усиление посредством эффекта лавинного умножения. С функциональной точки зрения они являются твердотельными аналогами фотоумножителей. Лавинные фотодиоды обладают большей чувствительностью по сравнению с другими полупроводниковыми фотоприёмниками, что позволяет использовать их для регистрации малых световых потоков (≈ 1 нВт). Сфера применения и эффективность ЛФД зависят от многих факторов, наиболее важными из которых являются:

- квантовая эффективность, которая показывает, какая доля падающих фотонов приводит к образованию носителей заряда и возникновению тока;
- суммарный ток утечек, который складывается из темнового тока и шумов.

Фототранзистор – оптоэлектронный полупроводниковый прибор (вариант биполярного транзистора). Отличается от обычного биполярного транзистора тем, что полупроводниковый базовый слой прибора доступен для воздействия внешнего оптического облучения, за счет этого ток через прибор зависит от интенсивности этого облучения.

Отличается от фотодиода тем, что обладает внутренним усилением фототока и поэтому большей чувствительностью к потокам оптического излучения. Основное преимущество фототранзисторов по сравнению с

фотодиодами заключается в высокой чувствительности к потоку излучения, а недостатки – низкое быстродействие и относительно большой темновой ток [4].

Фотодиодные линейки состоят из нескольких отдельных пикселей фотодиодов, установленных рядом друг с другом и образующих одномерную чувствительную область на подложке с общим катодом. Фотодиодные линейки используют для одновременного измерения движущегося луча или лучей с различными длинами волн. Они имеют низкие электрические перекрестные помехи и очень высокую однородность между соседними пикселями, которая позволяет использовать данные фотодиодные линейки для высокоточных измерений. Внешний вид фотодиодной линейки представлен на рис.10.20. (справа).

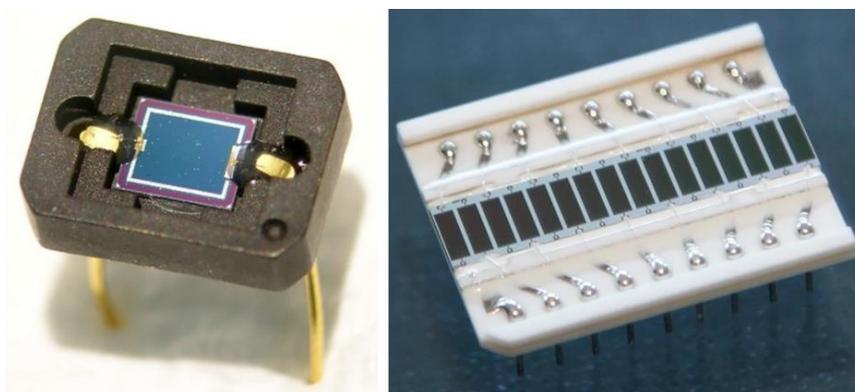


Рис. 10.20. Фотодиод (слева) и фотодиодная линейка (справа) [4].

Эти детекторы применяют для регистрации световых потоков в УФ, видимой или ближней ИК областях спектра. Например, фотодиодная линейка ФД-304М представляет собой линейку из 36-ти кремниевых фотодиодов размером каждого $0,7 \times 5$ мм с межэлементным зазором 0,1 мм. Длина линейки составляет 28,8 мм. Приемник выполнен в виде прямоугольного корпуса с перпендикулярно расположенными жесткими выводами [4].

Заключение

1. В предыдущих главах мы рассматривали свет с точки зрения волнового движения, а микроскоп - как визуальный прибор, в котором приемником излучения является глаз человека. В этой главе свет рассматривается как поток частиц (фотонов), а микроскоп – как передатчик световой энергии, которую приемник излучения преобразует в электрический сигнал. В результате при измерениях поглощения свет представляют как поток фотонов, а при настройке изображения, где основное значение имеют явления преломления, дифракции и интерференции, его представляют как волновое движение.

2. В предыдущих главах освещение в микроскопе, в основном, настраивается по Кёлеру, а различные методы контрастирования получают за счет вмешательства в апертурные диафрагмы и изменения соотношения числовых апертур осветительной и визуальной систем микроскопа. При регистрации поглощения освещение также настраивают по Кёлеру и уделяют внимание соотношению числовых апертур, но для измерений используют полевые диафрагмы, выделяя ими измеряемую структуру объекта.

3. Применение микроскопа в схеме фотометрического прибора обусловлено природой объекта, требующей высокой локальности измерения. При этом приходится мириться с возрастающей сложностью подготовки препарата, высокой трудоемкостью измерительных операций, сложностью аппаратуры, требующей высокой квалификации оператора, увеличением случайной погрешности из-за регистрации малых световых потоков.

4. Ценность информации, получаемой с помощью абсорбционной микрофотометрии, возрастает при ее сочетании с другими методами, например, с микрофлуориметрией, позволяющими получать более полное представление о структуре объекта.

5. При проведении количественных исследований приходится учитывать нестабильность аппаратуры, которая приводит к появлению различных случайных погрешностей. Источниками этих погрешностей могут стать:

- колебания яркости источника света;
- неоднородность фона в препарате;
- неточность отсчетов сигнала измерительной системы;
- шум приемника излучения;
- механическая нестабильность конструкции прибора;
- температурные деформации, вибрации и т.п.

Контрольные вопросы

1. Какие принципиальные различия в оптических схемах спектрофотометра при регистрации поглощения растворов в кювете и микроспектрофотометра при регистрации поглощения объекта на препарате?
2. Что представляет собой фотометрическая диафрагма? Ее место расположения и роль?
3. Что необходимо учитывать при подготовке препарата к фотометрированию? Укажите особенности настройки системы конденсор-препарат-объектив.
4. Что означает термин «ошибка распределения»?

Глава 11. СРЕДСТВА МОНОХРОМАТИЗАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ

Выбор спектральной области излучения зависит от свойств объекта и метода исследования. К основным средствам монохроматизации, используемых в микроскопии, относятся разнообразные светофильтры и спектральные приборы. Спектральные приборы используются для качественного и количественного исследования поглощенного, отраженного или рассеянного света объектом, а также для получения излучения заданного спектрального состава.

11.1. Светофильтры

Светофильтры, или просто *фильтры*, служат для подавления, выделения или преобразования светового потока и подразделяются на *нейтральные* и *селективные*. Нейтральные фильтры одинаково ослабляют свет в широком спектральном диапазоне. *Селективные* фильтры обладают преимущественным пропусканием (или отражением) в какой-либо спектральной области.

Селективные фильтры предназначены для выделения достаточно узкой спектральной области излучения. В микроскопии их применяют вместо более сложных спектральных приборов. Фильтры легко встраиваются в схему микроскопа, обладают компактностью, относительно высоким коэффициентом пропускания и низкой стоимостью. Однако они уступают монохроматорам по степени монохроматизации излучения. Селективные фильтры подразделяются на *абсорбционные* и *интерференционные*.

11.1.1. Абсорбционные фильтры

Принцип работы *абсорбционных фильтров* основан на избирательном поглощении света материалом фильтра. Наиболее популярным материалом является цветное стекло. Составные фильтры представляют собой комбинацию стекол разных марок и толщин. Пропускание таких комбинаций в видимой области спектра может достигать 30% при $\Delta\lambda = 30 - 50 \text{ нм}$. В микроскопии фильтры из цветного стекла используют для повышения контраста изображения и снижения рассеянного света (рис. 11.1.).

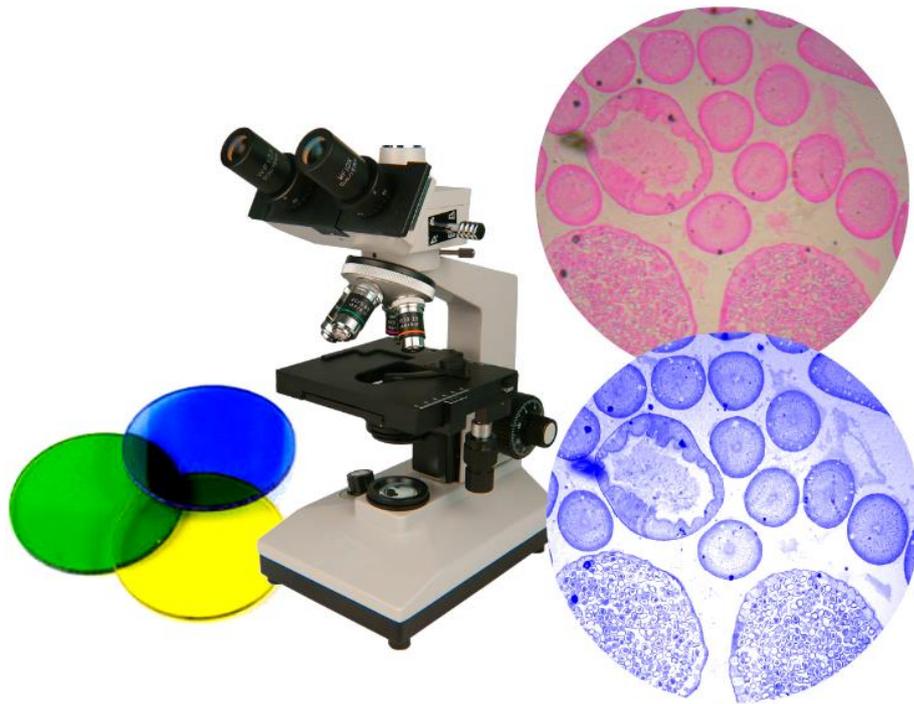


Рис. 11.1. Применение светофильтров из цветного стекла в осветительной системе микроскопа [41].

11.1.2. Интерференционные фильтры

Действие интерференционных фильтров основано на интерференции света в тонких пленках, в которых происходит многолучевая интерференция за счет многократных отражений между параллельными зеркалами, как в интерферометре Фабри-Перо.

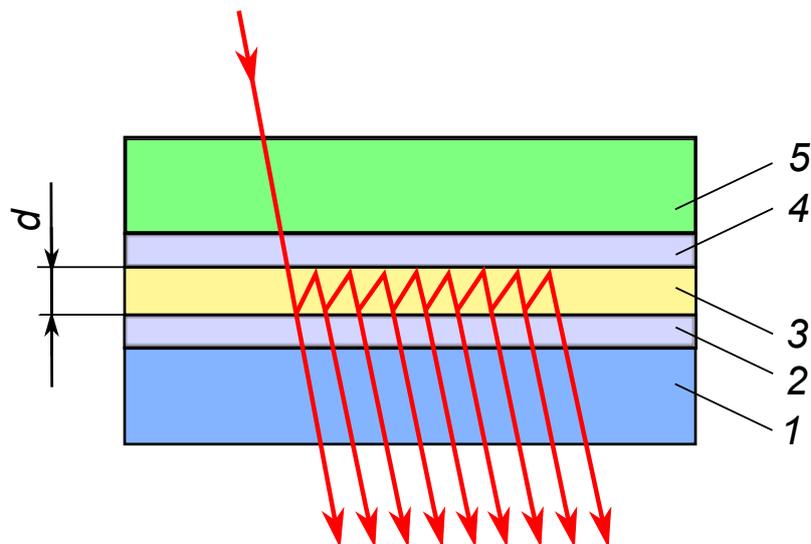


Рис. 11.2. Схема узкополосного интерференционного светофильтра.

1 – стеклянная подложка; 2 – диэлектрическое зеркальное покрытие; 3 – разделительный промежуточный слой; 4 – второе диэлектрическое зеркальное покрытие; 5 – пластина цветного стекла; d – толщина промежуточного слоя.

Фильтр состоит из двух частично пропускающих зеркал 2 и 4, разделенных прозрачным слоем диэлектрика 3, толщиной d порядка длины волны (рис. 11.2.). В качестве подложки 1 применяют стеклянную пластинку. Специфической особенностью интерференционных фильтров является наличие ряда полос пропускания разных порядков интерференции. Все они, кроме рабочей полосы, должны быть подавлены. Для этого в конструкцию фильтра вводят пластинку 5 из цветного стекла, которая подавляет побочные максимумы и дополнительно выполняет защитную роль.

Интерференционные фильтры позволяют выделять участки спектра различной ширины. Они делятся на три типа: узкополосные, полосовые и отсекающие. Узкополосные фильтры имеют сравнительно узкую полосу пропускания (рис. 11.3.а.), полосовые – более широкую (б), а отсекающие позволяют ограничивать спектральный состав излучения со стороны или коротковолновой, как показано на рис. 11.3.в., или длинноволновой области спектра.

Основными характеристиками узкополосных и полосовых фильтров являются средняя длина волны λ_{cp} , полуширина $\Delta\lambda$ и коэффициент пропускания τ (максимальный или средний). Для отсекающих фильтров указываются коротковолновая λ_k и длинноволновая λ_d границы пропускания на уровне $0,1\tau_{cp}$.

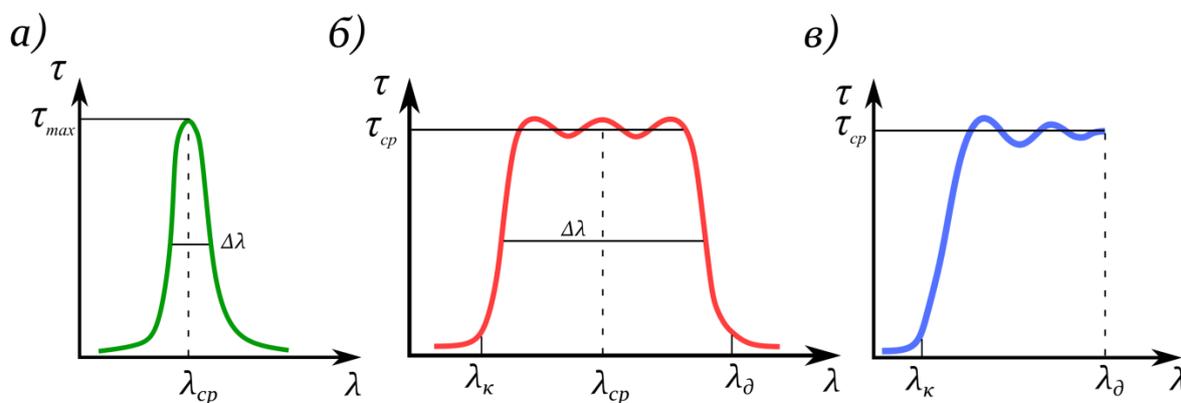


Рис. 11.3. Спектральные кривые пропускания различных типов интерференционных светофильтров: а) узкополосного; б) полосового; в) отсекающего.

Характеристики любого интерференционного фильтра зависят от угла падения света на поверхность фильтра. Наклон фильтра приводит к смещению полосы пропускания в коротковолновую область. При угле наклона 45° величина смещения составляет $20 - 30 \text{ нм}$. Этим иногда пользуются для подгонки длины волны, но злоупотреблять таким приемом нельзя, так как при увеличении угла наклона растет полуширина полосы пропускания. Практически для узкополосных фильтров (а) допустим наклон в пределах 10° [7].

Отрезающие фильтры позволяют разделить световой поток на проходящий и отраженный. В зависимости от характеристик фильтра эти потоки отличаются интенсивностью и спектральным составом. На рис. 11.4. представлены два отрезающих фильтра, первый из которых отражает красную λ_k составляющую спектрального диапазона $\Delta\lambda$ и пропускает зеленую и синюю ($\lambda_3 + \lambda_c$) составляющие, а второй разделяет эти компоненты на λ_3 и λ_c .

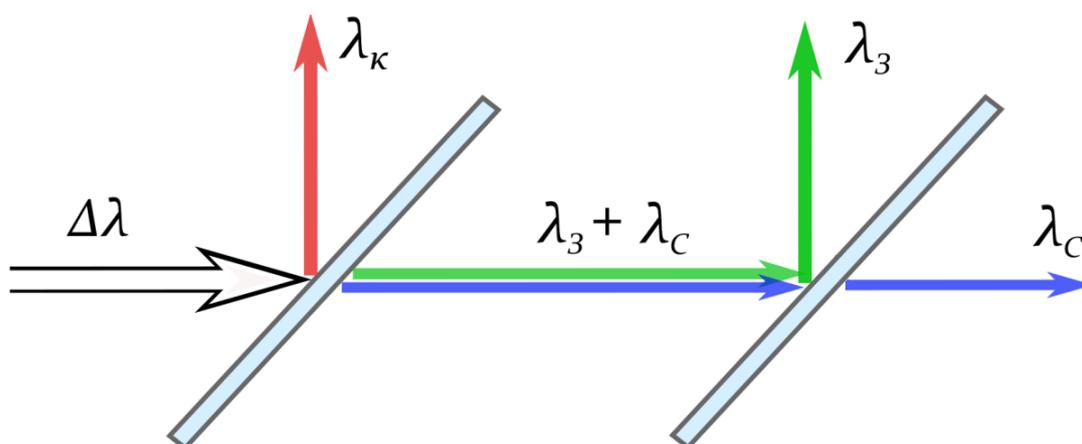


Рис. 11.4. Система из двух отрезающих интерференционных фильтров, расположенных под углом 45° к падающему потоку излучения.

$\Delta\lambda$ – спектральный диапазон потока; λ_k , λ_3 и λ_c – красная, зеленая и синяя составляющие потока, соответственно.

Фильтр необходимо размещать вдали от плоскости, сопряженной с предметной плоскостью микроскопа, чтобы дефекты его поверхности были незаметными на фоне изображения объекта. В осветительной части фильтр лучше всего устанавливать между коллектором и конденсором. Особого внимания требует установка интерференционных фильтров, которые могут давать блики из-за многократных отражений света от деталей микроскопа и зеркала фильтра. Подклейки из цветных стекол иногда могут люминесцировать, поэтому надо следить за тем, чтобы такая подклейка была обращена в сторону источника света.

11.1.3. Интерференционные линейки

Набор интерференционных фильтров позволяет перекрыть широкую спектральную область. Но этот набор может быть заменен интерференционным фильтром переменной длины волны, в котором используют слои переменной толщины. Перемещение такого фильтра относительно светового пучка обеспечивает плавное изменение длины волны. Фильтры переменной длины волны (нем. – Verlaufinterferenzfilter, англ. – graded spectrum filter) выпускает ряд оптических фирм. Например,

фирма Шотт (Германия) производит такие фильтры в виде линеек размером $20 \times 76 \text{ мм}^2$, охватывающих область $400 - 750 \text{ нм}$. При перемещении фильтра на 1 мм длина волны изменяется на 5 нм . Каждый миллиметр этого фильтра представляет собой самостоятельный фильтр с полушириной около 12 нм при пропускании 40% . Применение фильтров-линеек целесообразно в тех случаях, когда не требуется высокого спектрального разрешения [7].

11.2. Спектральные приборы

Приборы называют спектральными, если они осуществляют разложение излучения оптического диапазона на монохроматические составляющие. По способу спектрального разложения приборы, используемые в микроскопии, разделяют на призмные и дифракционные, а по оптической схеме и конструкции, зависящих от способа регистрации спектра, – на монохроматоры и полихроматоры.

Кроме призмных и дифракционных приборов, существует класс спектральных приборов, действие которых основано на интерференции света, например, интерферометр Фабри-Перо, пластинка Льюммера, эшелон Майкельсона, спектрометр с интерференционной амплитудной селективной модуляцией (сисам) и фурье-спектрометр. Эти приборы мы здесь рассматривать не будем.

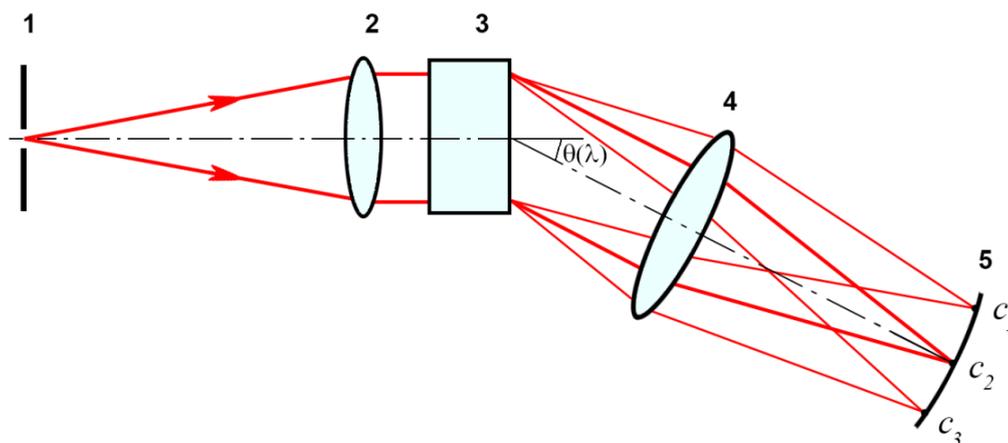


Рис. 11.5 Принципиальная оптическая схема спектрального прибора.

1 – входная щель; 2 – коллиматорный объектив; 3 – диспергирующий элемент; 4 – фокусирующий объектив; 5 – фокальная плоскость.

Принципиальная оптическая схема спектрального прибора представлена на рис. 11.5. Узкую *входную щель* 1, освещенную исследуемым излучением, устанавливают в фокальной плоскости *коллиматорного объектива* 2, который направляет от каждой точки щели параллельные пучки лучей на *диспергирующий элемент* 3. Диспергирующий элемент отклоняет эти пучки на различные углы $\theta(\lambda)$, величина которых является функцией длины волны λ . В результате он

превращает параллельный пучок, полученный из каждой точки щели, в веер монохроматических параллельных пучков. Фокусирующий объектив 4 создает в фокальной плоскости 5 изображения щели 1, совокупность которых и образует спектр (c_1, c_2, c_3).

Оптические схемы спектрального прибора и микроскопа имеют несколько принципиальных отличий [42].

1. В микроскопах применяют центрированную оптическую систему, в которой центры кривизны поверхностей всех линз и зеркал лежат на одной прямой, называемой *оптической осью*. При этом любая плоскость, проведенная через оптическую ось, является плоскостью симметрии. Оптическая же система спектрального прибора не является центрированной из-за наличия в ней диспергирующего элемента. Только одна плоскость, перпендикулярная направлению (длине H) входной щели, является плоскостью симметрии.

2. Микроскоп создает изображения каждой точки протяженного объекта лучами различных длин волн, а подобие между объектом и его изображением происходит при совмещении всех «цветных» изображений друг с другом. Спектральный прибор создает изображения узкой входной щели, а назначение его оптической системы состоит именно в пространственном разделении «цветных» изображений этой щели.

11.2.1. Основные характеристики спектрального прибора

К основным характеристикам спектрального прибора относятся угловая дисперсия, линейная дисперсия, относительное отверстие и спектральный диапазон.

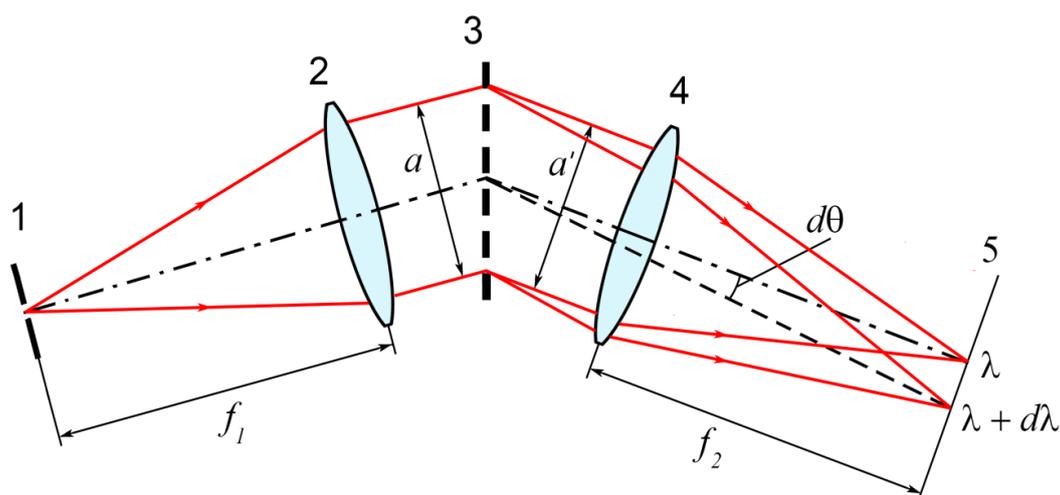


Рис. 11.6. Принципиальная оптическая схема спектрального прибора, поясняющая определение линейной дисперсии [42].

1 – входная щель; 2 – коллиматорный объектив с фокусом f_1 ; 3 – диспергирующий элемент; 4 – фокусирующий объектив с фокусом f_2 ; 5 – фокальная плоскость.

1. *Угловая дисперсия* является характеристикой диспергирующего элемента, способного отклонять излучение различных длин волн на разные углы. Если лучи двух близких длин волн λ и $\lambda+d\lambda$ отклоняются на углы θ и $\theta+d\theta$, то угловая дисперсия определяется как производная $d\theta/d\lambda$ (рис. 11.6.).

2. *Линейная дисперсия* является характеристикой прибора и зависит от его конкретных параметров. Ее величина показывает, на сколько далеко (в линейной мере) отстоят друг от друга близкие длины волн в плоскости фокусировки спектра. Линейную дисперсию определяют как производную $dl/d\lambda$, где dl – линейное расстояние между точками λ и $\lambda+d\lambda$ (рис. 11.6.).

3. *Обратная линейная дисперсия*. Часто спектральный прибор характеризуют величиной, называемой обратной линейной дисперсией:

$$\frac{d\lambda}{dl} = \frac{1}{dl/d\lambda}$$

Обратную линейную дисперсию выражают в *мкм/мм* или *нм/мм*.

4. *Апертурной диафрагмой* спектрального прибора служит оправа диспергирующего элемента, так как сечение пучка a , создающего монохроматическое изображение входной щели, зависит именно от размера этого элемента (обычно прямоугольной формы со сторонами a и H). *Относительное отверстие* объектива диаметром D и фокусным расстоянием f характеризуют величиной $\varepsilon = D/f$. Однако энергетические характеристики прибора – освещенность изображения, пропускаемый лучистый поток – определяются площадью входного зрачка независимо от его формы. Прямоугольный зрачок со сторонами a и H эквивалентен круглому зрачку такого диаметра D , что

$$aH = \frac{\pi D^2}{4}.$$

5. *Поле зрения* является фокальная плоскость фокусирующего объектива, а размер поля зависит от размера выходной щели. Условия работы коллиматорного и фокусирующего объективов отличаются тем, что через коллиматорный объектив проходит неразложенное в спектр излучение (белый свет), а на фокусирующий объектив направляется веер цветных параллельных пучков.

6. *Аберрации оптической системы*. Аберрации спектральных приборов влияют на качество изображения выходной щели, что приводит к перераспределению и снижению освещенности ее изображения. Этим самым они влияют на результаты измерений, но рассматривать аберрации спектральных приборов здесь мы не будем [42].

11.2.2. Диспергирующие элементы

В микроскопии в качестве диспергирующих элементов используют призмы и дифракционные решетки. Физические явления, лежащие в основе их работы, различаются, но главной характеристикой обоих типов элементов является угловая дисперсия. Однако величина угловой дисперсии и ее зависимость от длины волны у призм и решеток существенно различаются, что и определяет область их применения.

1. Спектральная призма. Применение трехгранных призм и призмных систем основано на зависимости показателей преломления материалов, из которых они изготовлены, от длины волны. На рис. 11.7. представлен ход лучей в трехгранной призме с углом при вершине A .

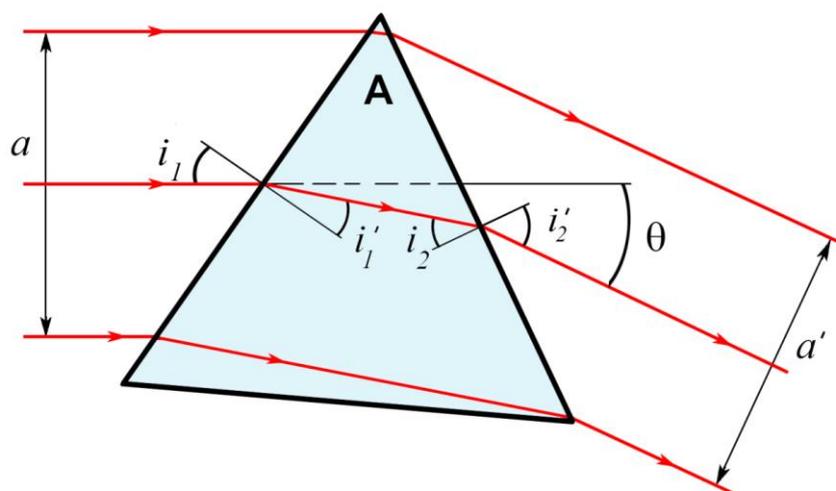


Рис. 11.7. Ход лучей в трехгранной призме [42].

A – преломляющий угол; i_1 – угол падения на первую грань; i_2 и i_2' – углы падения и преломления на вторую грань; θ – угол отклонения; a и a' – размер параллельного пучка лучей.

Как правило, призму устанавливают в параллельном ходе лучей, а после ее прохождения лучи отклоняется в сторону основания призмы на угол:

$$\theta = i_1 + i_2' - A.$$

Угол отклонения θ есть функция трех переменных: показателя преломления n , преломляющего угла A и угла падения i_1 на первую грань. При данном угле падения i_1 угол θ возрастает как с увеличением угла A , так и с увеличением n . Показатель преломления, в свою очередь, зависит от длины волны λ , и с уменьшением длины волны он возрастает. Поэтому коротковолновое излучение сильнее отклоняется призмой, чем длинноволновое. Призма дает только один спектр, а ее угловая дисперсия зависит от материала и определяется как производная угла отклонения θ по длине волны λ [42].

На рис. 11.8. представлены различные типы спектральных призм. Преломляющий угол трехгранной призмы (а) равен 60° . В автоколлимационных схемах применяют призму Литтрова (б), большой катет которой покрыт зеркальным слоем. Дисперсия такой призмы равна дисперсии одной призмы с углом при вершине $A = 60^\circ$.

Призма Амичи (призма прямого зрения) состоит из трех или более трехгранных призм (в), а ее особенность заключается в том, что для длины волны середины спектра угол отклонения луча равен нулю. Среднюю призму изготавливают из флинта, а две боковые - из крона. В приборах с призмой Амичи оптическая ось не имеет излома. При этом короткие длины волн отклоняются в сторону основания средней призмы, а длинноволновые - в сторону ее вершины.

Призма Розерфорда-Броунинга (г) состоит из трех частей: между двумя одиночными призмами ($A_1 \sim 25^\circ$) из крона находится призма из флинта ($A_2 \sim 100^\circ$). Дисперсия призмы Розерфорда-Броунинга в 1,5 – 2 раза превышает дисперсию одиночной призмы.

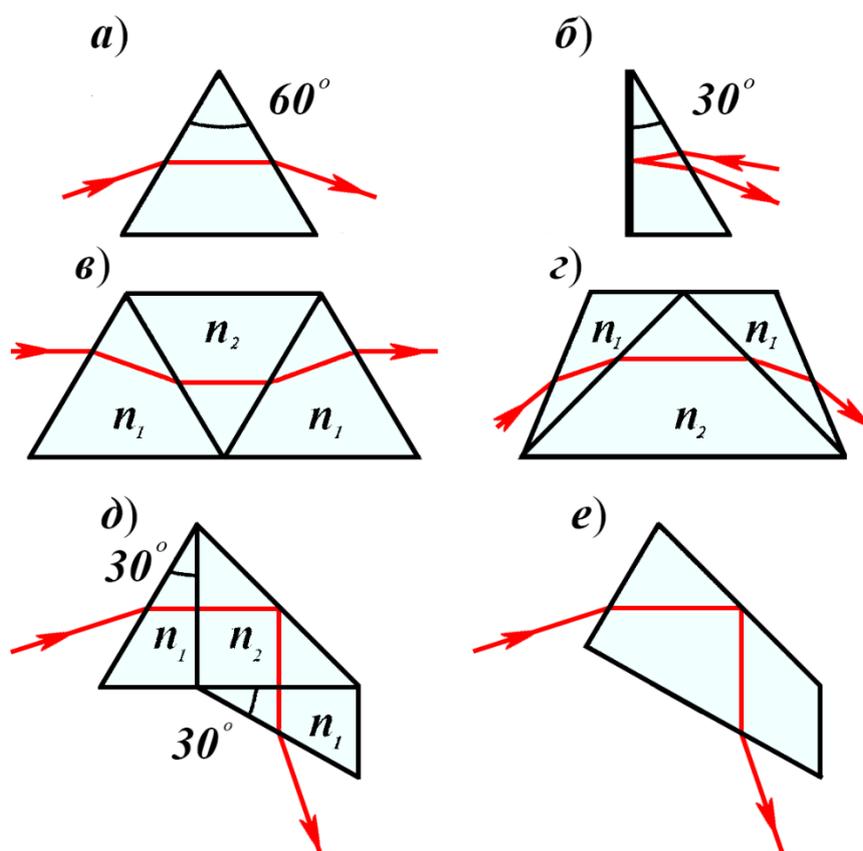


Рис. 11.8. Типы спектральных призм.

а) трехгранная призма; б) призма Литтрова; в) призма Амичи; г) призма Розерфорда - Броунинга; д) призма Аббе (составная); е) призма Аббе (из единой заготовки) [43].

Призма Аббе (д) – призма постоянного угла отклонения, состоит из двух 30-градусных и одной равнобедренной прямоугольных призм.

Равнобедренная прямоугольная призма не влияет на дисперсию, а отклоняет луч на 90° . Дисперсия происходит лишь на гранях внешних призм. Таким образом, луч, выходящий из призмы Аббе, покидает ее под прямым углом к входящему лучу. По угловой дисперсии эта система эквивалентна одиночной призме $\angle A = 60^\circ$. Все три призмы могут быть изготовлены из одного материала ($n_1 = n_2$), в этом случае призма Аббе представляет собой единый блок стекла (e).

2. Различные типы дифракционных решеток. Дифракционная решетка представляет собой совокупность большого числа регулярно расположенных штрихов (канавок, щелей, выступов), нанесенных тем или иным способом на плоскую или вогнутую поверхность. Расстояние e между штрихами называют *постоянной решетки* или *периодом решетки*. Часто решетку характеризуют числом штрихов на единицу длины $N = 1/e$ (например, $N = 1200 \text{ мм}^{-1}$). Дифракционные решетки бывают различных типов: прозрачные и отражательные, плоские и вогнутые, а по технологии изготовления - нарезные и голографические [42].

1. *Прозрачные дифракционные решетки* изготавливают нанесением штрихов на поверхность пластинки из прозрачного материала (например, стекла) и устанавливают в проходящем свете. Такие решетки редко применяют в спектральных приборах из-за их низкой эффективности.

2. *Плоская отражательная дифракционная решетка* с профилем штриха в виде канавки. Решетка представляет собой совокупность узких равноотстоящих параллельных зеркальных полосок, разделенных малыми промежутками (рис. 11.9.а.). Угол падения φ – угол между нормалью N к плоскости решетки и падающим лучом; угол дифракции φ' – угол между дифрагированным лучом и нормалью к плоскости решетки.

В спектральном приборе решетку устанавливают в наклонном параллельном пучке лучей. При этом ее штрихи располагают параллельно длине входной щели. В отраженном свете в фокальной плоскости фокусирующего объектива получают дифракционную картину от каждой зеркальной полоски, как от узкой щели. Пучки, дифрагированные на отдельных полосках, интерферируют между собой. Между углом падения φ и углами дифракции φ' имеет место соотношение, называемое уравнением решетки:

$$\sin \varphi + \sin \varphi' = \frac{k\lambda}{e},$$

где $k = 0; \pm 1; \pm 2; \dots$ – порядок дифракционного спектра.

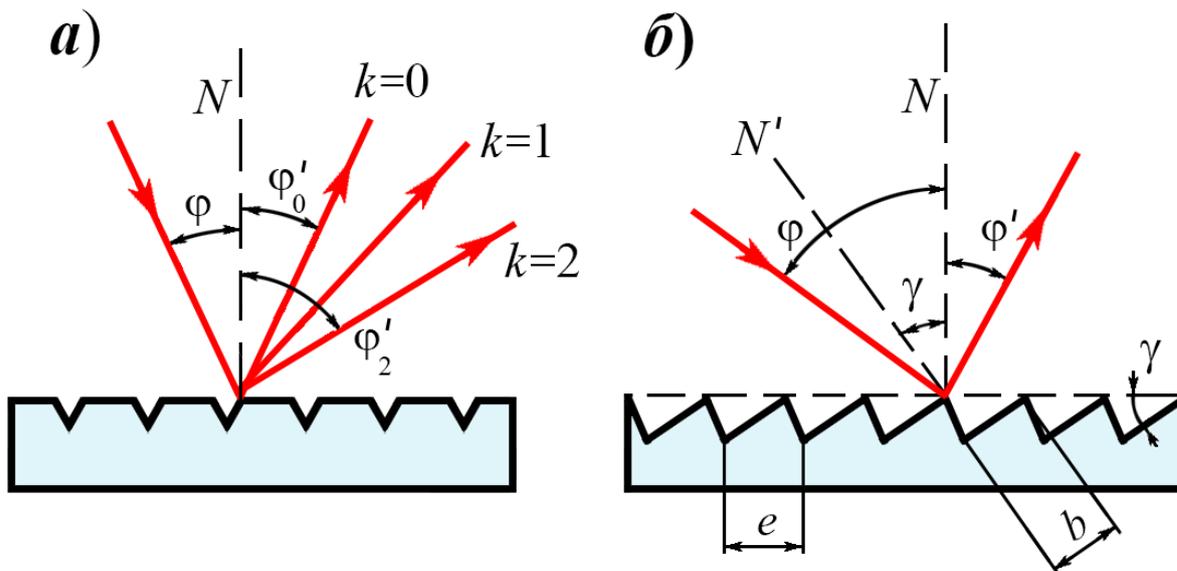


Рис. 11.9. Дифракция на плоской отражательной дифракционной решетке.

а) решетка с профилем штриха в виде канавки; б) решетка-эшелетт.

При падении на решетку монохроматического излучения в фокальной плоскости фокусирующего объектива получают ряд монохроматических изображений щели, соответствующих различным значениям числа k . Если же падающее излучение имеет сложный спектральный состав, то при данном угле падения φ для каждого k угол дифракции φ' есть функция длины волны λ . Таким образом, каждому значению целого числа k соответствует отдельный спектр k -го порядка. Только для $k = 0$ получают не разложенное в спектр изображение щели, называемое спектром нулевого порядка. В нулевом порядке, независимо от длины волны, $\varphi' = -\varphi$, что соответствует отражению от решетки, как от плоского зеркала [42].

Итак, дифракционная решетка дает возможность одновременно получать несколько спектров различных порядков. Однако спектры различных порядков (кроме нулевого) могут налагаться друг на друга. Это связано с тем, что при заданных углах φ и φ' уравнению решетки удовлетворяют несколько значений длин волн λ , соответствующих разным k . В результате углы дифракции φ' оказываются одинаковыми для всех спектральных линий, у которых произведение $k\lambda = \text{const}$. Например, в спектре первого порядка для коротковолновой границы $\lambda_{к1} = 250 \text{ нм}$ свободной областью будет интервал $250 - 500 \text{ нм}$. При длинноволновой границе $\lambda_{д1} = 500 \text{ нм}$ произойдет наложение длины волны $\lambda_{к2} = 250 \text{ нм}$ из спектра второго порядка. По той же причине на длинноволновую границу $\lambda_{д1} = 700 \text{ нм}$ ляжет $\lambda_{к2} = 350 \text{ нм}$ второго порядка и т.д. Убирают налагающиеся порядки с помощью фильтров, которые срезают УФ область. [7, 42].

В спектрах различных порядков энергия излучения распределяется неодинаково. Большая часть энергии отражается от решетки как от зеркала, без спектрального разложения (нулевой порядок), другая часть распределяется между спектрами различных порядков по обе стороны от нормали к поверхности решетки. Это распределение зависит от формы канавок, образуемых резцом при нанесении штрихов на заготовку решетки. В результате даже в первом порядке решетки с профилем штриха в виде канавки количество света оказывается недостаточным.

3. *Плоская отражательная дифракционная решетка-эшелетт* (эшелетт – от французского *échelette* – лестница). Решетка-эшелетт имеет несимметричную треугольную форму штрихов и состоит из одинаковых зеркальных площадок шириной b , плоскости которых параллельны друг другу и образуют угол γ с общей касательной плоскостью всех зеркальных элементов, т.е. с плоскостью заготовки (рис.11.9.б.). При падении на эшелетт параллельного пучка лучей происходит дифракция на каждой зеркальной площадке. Пучки, дифрагированные на всех площадках, интерферируют между собой. Угол γ называют *углом блеска*, e – период решетки.

Форма штриха зависит от формы режущей грани резца делительной машины. Основное отличие и преимущество решетки-эшелетта заключается в концентрации большей части падающего на нее излучения (до 80%) в один из порядков спектра (чаще всего в первый), что позволяет создавать спектральные приборы высокой эффективности.

4. *Вогнутая отражательная дифракционная решетка*. Штрихи наносят на вогнутую (обычно сферическую) зеркальную поверхность заготовки. Такие решетки одновременно выполняют роль диспергирующего элемента и фокусирующей системы, т. е. не требуют применения в спектральном приборе коллиматорного и фокусирующего объективов. При этом входная щель l и порядки дифракционных спектров k располагаются на окружности, диаметр которой равен радиусу кривизны R сферической поверхности решетки (рис. 11.10.).

5. *Голографические дифракционные решетки*. Метод изготовления плоских и вогнутых голографических дифракционных решеток был разработан в 1970-х годах. В этом методе подложку (плоскую или вогнутую) покрывают светочувствительным слоем фоторезиста и освещают двумя когерентными пучками лазерного излучения. В области пересечения этих пучков формируется интерференционная картина с синусоидальным распределением освещенности. Голографическую отражательную решетку получают в результате обработки экспонированного слоя фоторезиста и нанесения на него отражающего покрытия. Голографические методы не позволяют изготовить эшелетт со

строго треугольной несимметричной формой штриха, но дают возможность приближения к этой форме [42].

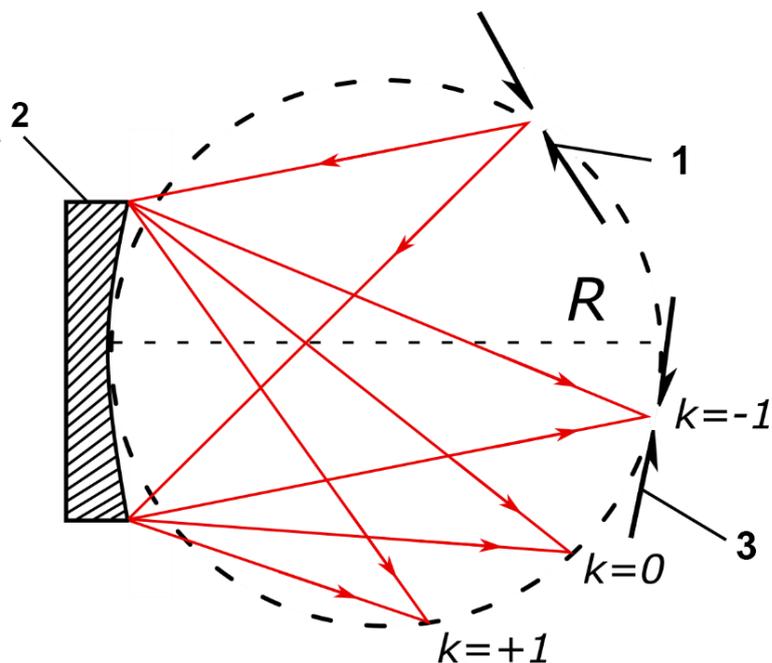


Рис. 11.10. Схема образования спектров вогнутой дифракционной решеткой на круге Роуланда.

1 – входная щель; 2 – вогнутая дифракционная решетка с радиусом кривизны R ;
3 – выходная щель; k – порядок дифракции.

Качество дифракционных решеток определяют величиной рассеянного света, вызванного мелкими дефектами на гранях отдельных штрихов, и наличием «духов» – ложных линий, возникающих в спектре из-за нарушений в расположении штрихов у нарезных решеток. В отличие от нарезных, голографические решетки отличаются отсутствием «духов» и низким уровнем рассеянного света.

6. *Реплика дифракционной решетки.* Дифракционная решетка – это прецизионный и дорогой оптический элемент, требующий для своего изготовления уникального оборудования. Более доступными являются копии решеток – так называемые, *реплики*, которые по своим свойствам практически не уступают оригиналам. Реплику получают путем изготовления отпечатка на желатине и специальных пластмассах с нарезной дифракционной решетки.

3. *Сравнение свойств призм и решеток.* При выборе диспергирующего элемента следует обращать внимание на спектральный диапазон его работы, величину угловой дисперсии, пропускание, габариты, стоимость и т.д. Сравним основные свойства призм и решеток.

1. Спектральный диапазон призмы зависит от прозрачности материала, из которого она изготовлена. Расширение диапазона возможно за счет использования нескольких сменных призм. В отличие от призм, одна решетка может работать в широком спектральном диапазоне.

2. Угловая дисперсия решетки почти не зависит от длины волны, что удобно для измерений отдельных спектральных линий. Линейную зависимость расстояний между линиями достигают с помощью синусного механизма разворота решетки. Дисперсия призм значительно меняется с длиной волны, быстро возрастая по мере приближения к коротковолновой или длинноволновой границе поглощения материала, что приводит к нелинейной зависимости расстояний между линиями.

3. Дифракционные решетки обладают некоторыми недостатками по сравнению с призмой. Призма дает только один спектр, а решетка – много налагающихся друг на друга спектров разных порядков, и для подавления этих спектров необходимо использовать светофильтры или дополнительные диспергирующие элементы. Все это снижает пропускание прибора с решетками.

4. Коэффициенты пропускания призмных приборов и приборов с решетками примерно одинаковые, но в области прозрачности призмы ее пропускание практически постоянно, тогда как у решетки в пределах спектра одного порядка коэффициент отражения может изменяться.

Таким образом, дифракционные решетки целесообразно использовать в спектральных приборах с высокой дисперсией и разрешающей способностью или для уменьшения габаритов прибора. Призмы применяют в менее ответственных качественных и полуколичественных методах спектрального анализа.

11.3. Монохроматор

Монохроматор предназначен для выделения узких участков спектра излучения. Конструкция монохроматора включает входную и выходную щели, коллиматорный и фокусирующий объективы и диспергирующий элемент с механизмом его поворота. Существует большое разнообразие схем монохроматоров.

11.3.1. Призмный одинарный монохроматор

Призмный монохроматор применяют для работы в видимой и УФ областях спектра. На рис. 11.11. представлена одна из возможных схем призмного монохроматора, используемого в микроскопии. Диспергирующим элементом в УФ области служит кварцевая призма, а в видимой – стеклянная. Большой катет 30-градусной призмы 6 покрыт отражающим слоем, так что свет при прохождении призмы диспергирует дважды. Функции коллиматорного и фокусирующего объектива

выполняет одно и то же вогнутое зеркало 5. Расположение элементов схемы таково, что выходящий монохроматический пучок является продолжением входящего пучка белого света. Такая схема хорошо согласуется со схемой микроскопа [7].

Монохроматор имеет нелинейную зависимость длины волны от угла поворота призмы, что приводит к увеличению ширины выделяемого интервала в области больших длин волн. Например, при работе с кварцевой призмой на длине волны 400 нм, которая для этой призмы приближается к длинноволновой границе, через щель шириной 1 мм проходит $\Delta\lambda \approx 20$ нм. Ситуация в видимой области улучшается при замене кварцевой призмы на стеклянную, что и предусмотрено в приборе.

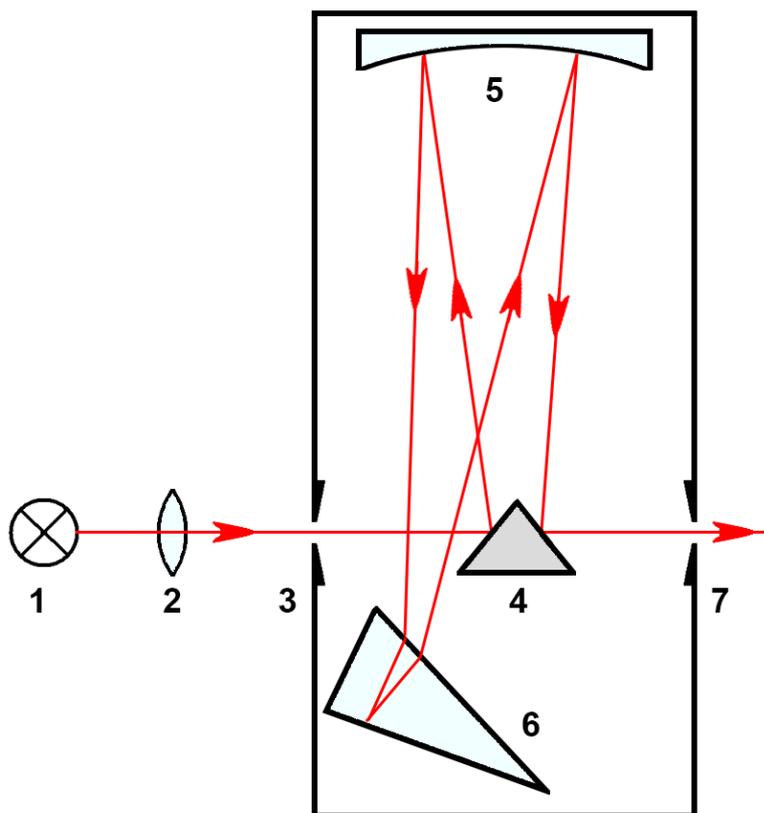


Рис. 11.11. Схема призматического монохроматора.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – зеркальная призма; 5 – вогнутое зеркало; 6 – диспергирующая призма Литтрова; 7 – выходная щель.

11.3.2. Одинарный монохроматор с дифракционной решеткой

На рис. 11.12. представлена принципиальная схема монохроматора Эберта-Фасти. В этой схеме выходящий монохроматический пучок также расположен на одном уровне с входящим пучком от источника 1, а функции коллиматорного и фокусирующего объективов выполняет одно и то же вогнутое зеркало 5. Монохроматор такой «сквозной» конструкции удобно компоновать с микроскопом [7].

Излучение источника света 1 (например, лампы накаливания) проецируется линзой 2 на входную щель 3. Часть сферического зеркала 5, выполняющего роль коллиматорного объектива, направляет параллельный пучок лучей на решетку 6. Решетка разворачивает это излучение в веер параллельных пучков. Другая часть этого же сферического зеркала 5, выполняющего теперь роль фокусирующего объектива, создает целый ряд спектров разных порядков. Каждый спектр представляет собой непрерывную (или дискретную, например, с ртутной лампой) последовательность монохроматических изображений щели 3. Выходная щель 8 выделяет из спектра выбранного порядка (обычно первого) более или менее узкий интервал $\Delta\lambda$ в зависимости от ширины щели.

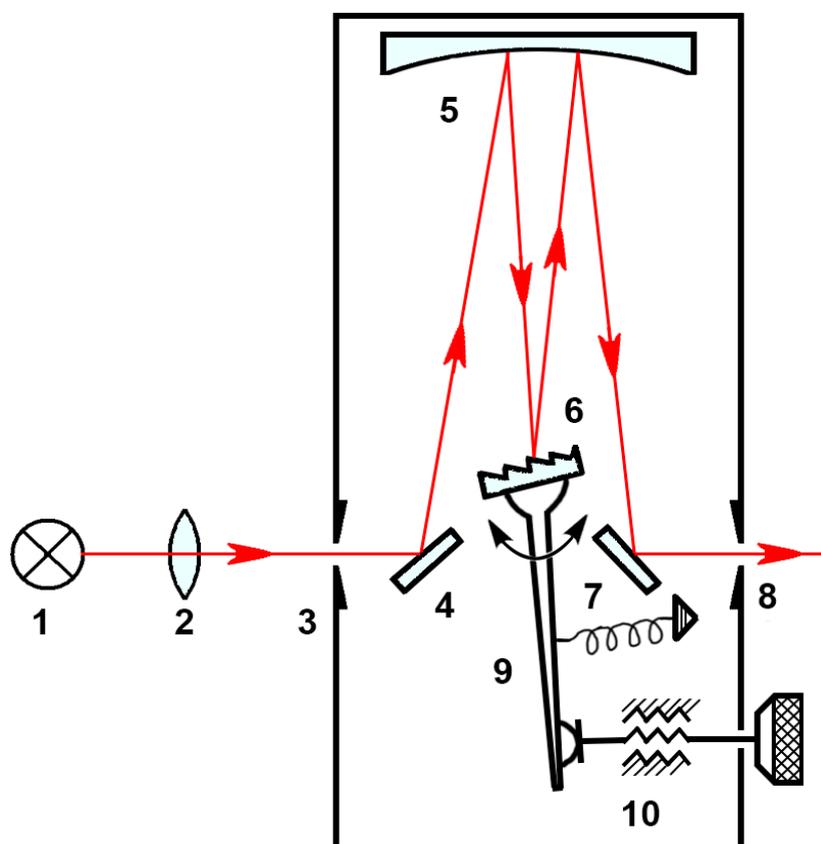


Рис. 11.12 Схема монохроматора с плоской дифракционной решеткой по схеме Эберта-Фаста.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – поворотное зеркало; 5 – вогнутое зеркало; 6 – дифракционная решетка; 7 – поворотное зеркало; 8 – выходная щель; 9 – рычаг поворота решетки; 10 – винт-толкатель со шкалой.

Особенность дифракционной решетки состоит в том, что длина волны пропорциональна синусу угла поворота решетки. Благодаря этому с помощью синусного механизма, состоящего из рычага 9 и винта 10, удастся получить равномерную оцифровку шкалы длин волн

монохроматора. Кроме того, монохроматор с решеткой при тех же спектральных характеристиках имеет меньшие габариты по сравнению с призмным монохроматором.

11.3.3. Двойной монохроматор

Во всех одинарных монохроматорах в выходную щель, кроме разложенного в спектр излучения, всегда попадает некоторое количество паразитного света других длин волн. Причиной этого могут служить дефекты решетки, а также отражение и рассеяние света на оптических и механических деталях прибора. В одинарном монохроматоре рассеянный свет уменьшают с помощью светофильтров.

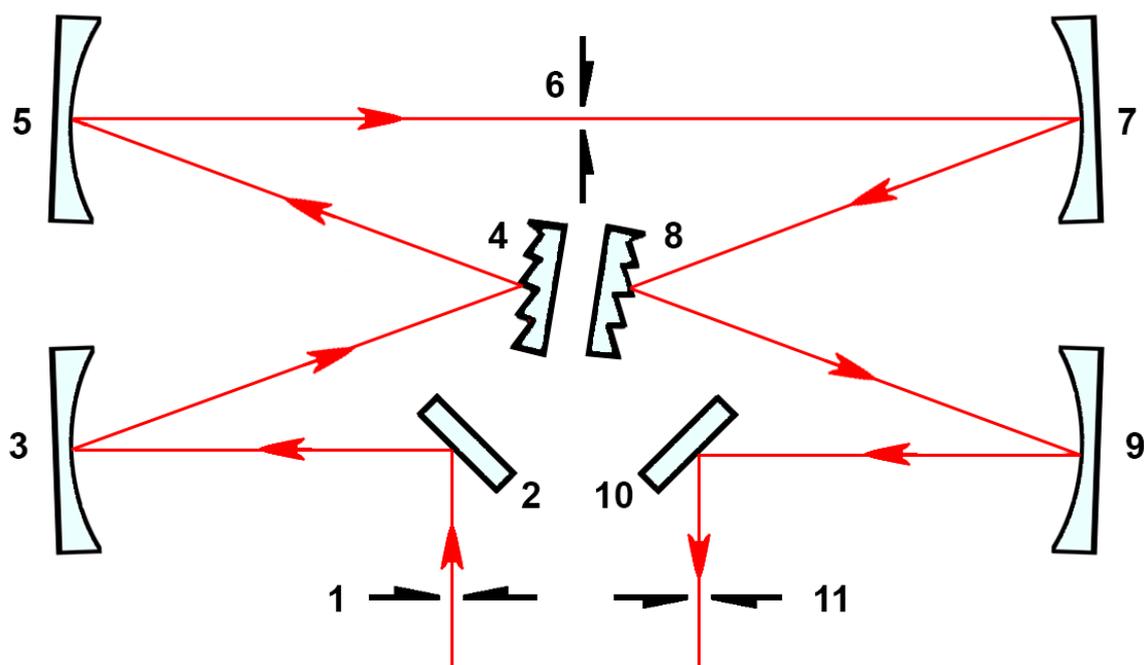


Рис. 11.13. Двойной монохроматор.

1 – входная щель; 2 и 10 – поворотные зеркала; 3, 5, 7, 9 – вогнутые зеркала; 4 и 8 – дифракционные решетки; 6 – промежуточная щель; 11 – выходная щель.

Наиболее надежным способом устранения паразитного света является применение двойного монохроматора, состоящего из двух одинарных монохроматоров (рис. 11.13.). Первый монохроматор состоит из элементов 1 – 6, а второй – из элементов 6 – 11. При этом выходная щель 6 первого монохроматора служит входной щелью второго. Дисперсии монохроматоров могут складываться или вычитаться в зависимости от взаимного расположения решеток. Для микроспектрофотометров высокого спектрального разрешения (например, регистрация спектров комбинационного рассеяния) нужна схема со сложением дисперсий. Для микрофлуориметрии применяют схему с вычитанием дисперсии, так как дисперсия одинарного

монохроматора оказывается достаточной для формирования возбуждающего света, а важной задачей становится снижение уровня рассеянного света.

11.4. Полихроматор

Особенность оптической схемы полихроматора заключается в выделении *одновременно* нескольких узких интервалов длин волн с помощью набора выходных щелей, расположенных вдоль фокальной поверхности (не всегда плоской) фокусирующего объектива. Щели могут либо перемещаться по этой поверхности, либо закрепляться на ней неподвижно. Диспергирующий элемент (призму или решетку) устанавливают в фиксированное положение с постоянным углом отклонения. Основные характеристики полихроматора определяют таким же образом, как и монохроматора [42].

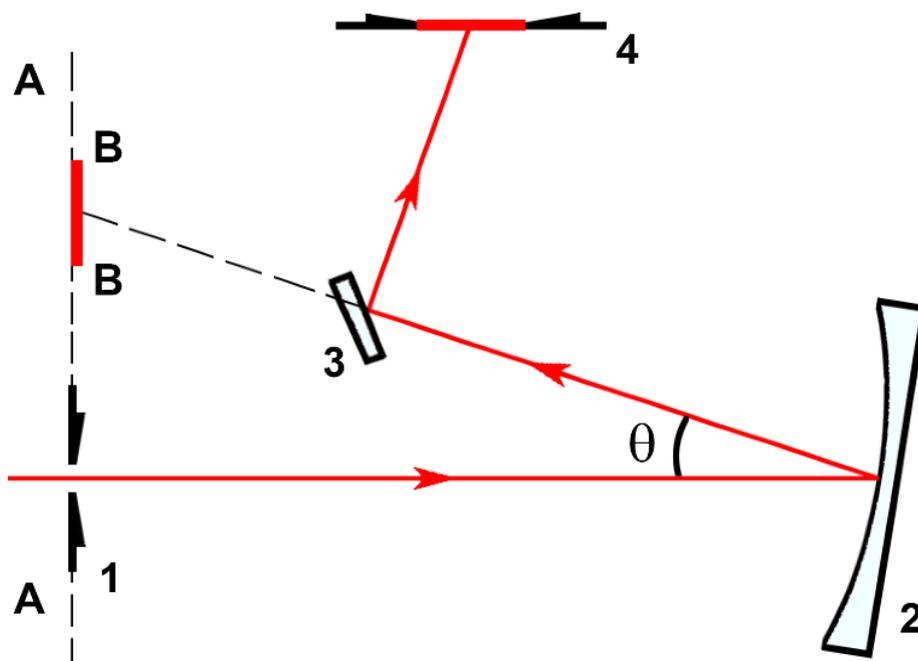


Рис. 11.14. Полихроматор с вогнутой дифракционной решеткой.

1 – входная щель; 2 – вогнутая дифракционная решетка; 3 – поворотное зеркало; 4 – выходная щель.

В полихроматоре регистрацию спектра осуществляют либо одним приемником за счет перемещения щелей (сканирование щелями), либо с помощью фотодиодной линейки, установленной за неподвижной широкой щелью. На рис. 11.14. представлена одна из схем полихроматора с вогнутой дифракционной решеткой 2. В данной схеме применяют вогнутую решетку с переменным шагом, т.е. с линейно изменяющимися расстояниями между штрихами. Переменный шаг позволяет компенсировать астигматизм, присущий вогнутым решеткам. Щель 1 и ее

Изображение BB находится на одной прямой AA . Изображение щели (отрезок BB) с помощью плоского поворотного зеркала 3 совмещается с неподвижной выходной щелью 4, в плоскости которой устанавливают фотодиодную линейку. Каждый элемент фотодиодной линейки регистрирует падающий на него узкий спектральный диапазон. В результате все элементы линейки одновременно осуществляют регистрацию спектра, выделенного выходной щелью 4 (обычно первого порядка). Применение такого полихроматора целесообразно при регистрации спектров образцов с динамическим изменением спектра во время его регистрации, например, выцветание флуоресценции под действием возбуждающего света.

11.5. Согласование монохроматора с микроскопом

Монохроматор устанавливают до и/или после микроскопа. Независимо от места расположения, его оптические характеристики должны быть согласованы с характеристиками микроскопа, а не наоборот. На рис. 11.15. представлена принципиальная оптическая схема микроспектрофотометра с двумя монохроматорами, один из которых расположен в осветительной части прибора, а второй – в приемно-регистрирующей части. Если $\Delta\lambda_1$ – спектральная ширина входной щели, а $\Delta\lambda_2$ – спектральная ширина выходной щели, то для сплошного спектра диапазон выделяемого излучения равен

$$\Delta\lambda = \Delta\lambda_1 + \Delta\lambda_2$$

При заданной величине $\Delta\lambda$ условием получения максимального светового потока является равенство спектральных размеров входной 3 и выходной 5 щелей. В микроспектрофотометрах это требование трудно выполнить, так как размер выходной щели связан с изменяющимися величинами полевых и апертурных диафрагм микроскопа. Обычно ориентируются на некоторые средние условия эксперимента.

1. *Монохроматор осветительной системы.* Монохроматор 4 должен обеспечить заполнение апертуры конденсора 7 монохроматическим светом для освещения препарата 8. Выходная щель 5 играет роль источника света и может иметь прямоугольную, квадратную, круглую или произвольную форму. Коллекторная линза 6 проецирует ее изображение в апертурную диафрагму конденсора 7, осуществляя тем самым освещение по Кёлеру, поэтому каждая точка объекта освещается одинаковым интервалом $\Delta\lambda$. Однако надо помнить, что размер апертурной диафрагмы конденсора влияет на разрешающую способность микроскопа.

При выведении коллектора 6 из хода лучей в схеме реализуется критический способ освещения. Конденсор 7 создает уменьшенное изображение щели 5, выделяющей интервал $\Delta\lambda$, в плоскости препарата 8.

В этом случае щель 5 служит полевой диафрагмой. Если эта полевая диафрагма используется для выделения измеряемой структуры объекта, то необходимо помнить, что изменение ее размера приводит к изменению выделяемого спектрального интервала.

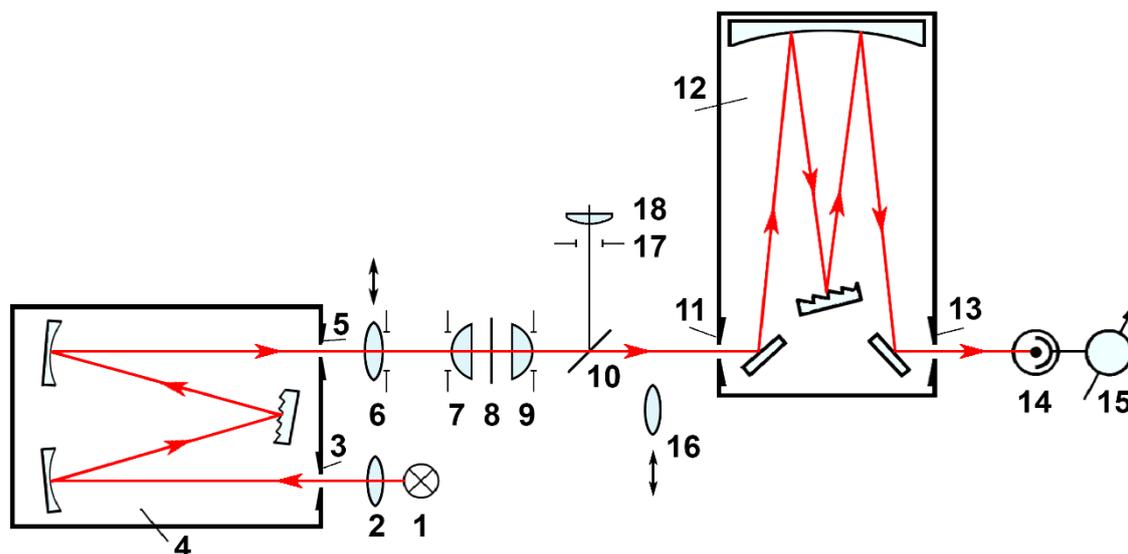


Рис. 11.15. Способы соединения монохроматора с микроскопом.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – монохроматор осветительной системы; 5 – выходная щель; 6 – коллектор с полевой диафрагмой; 7 – конденсор; 8 – препарат; 9 – объектив; 10 – полупрозрачное зеркало (светоделительный кубик); 11 – входная щель; 12 – монохроматор приемно-регистрирующей системы; 13 – выходная щель; 14 – приемник; 15 – измерительный прибор; 16 – линза; 17 – полевая диафрагма; 18 – окуляр.

2. Монохроматор приемно-регистрирующей системы.

Монохроматор 12 расположен между плоскостью изображения и приемником излучения 14. Если входная щель 11 установлена в плоскости изображения, то она выступает в роли фотометрической диафрагмы. В этом случае ее размер, с одной стороны, зависит от размера фотометрируемой структуры, а с другой – определяет выделяемый спектральный интервал. Кроме того, при изменении размеров фотометрической щели меняется размер и место на фоточувствительном слое приемника, который, возможно, не является однородным по чувствительности. При введении в ход лучей линзы 16 на входную щель 11 проектируется выходной зрачок объектива 9, размер которого не зависит от размера измеряемой структуры объекта, а изменяется только со сменой объектива.

На рис. 11.15. стрелками отмечено направление распространения светового сигнала в измерительном канале прибора. Если сопоставить длину этого пути с размером исследуемой структуры, то станут понятными высокие требования к настройке и эксплуатации микроспектрофотометров. Экспериментатор осуществляет настройку

изображения и выбор исследуемой структуры с помощью визуального канала: зеркала 10 и окуляра 17 – 18.

Заключение

1. Понимание и осознанный выбор оптимального варианта оптической схемы спектрального прибора и его согласование со схемой микроскопа способствуют эффективному использованию микроспектрофотометра для получения достоверных данных.
2. В микроспектрофотометрах, в основном, применяют монохроматоры с отражательными дифракционными решетками для регистрации спектров поглощения, флуоресценции, комбинационного рассеяния, т.е. в тех случаях, когда требуется высокое спектральное разрешение. Призмные монохроматоры используются при малых и средних разрешениях. Кроме того, за призмами сохраняется роль вспомогательных диспергирующих элементов и элементов предварительной монохроматизации.
3. Регистрация спектров комбинационного рассеяния микрообъектов требует применения монохроматоров с предельными характеристиками по разрешающей способности и уровню рассеянного света (одинарных и двойных монохроматоров с высокоэффективными дифракционными решетками).
4. Полихроматоры целесообразно использовать при исследованиях объектов, требующих одновременной регистрации нескольких спектральных диапазонов.
5. Интерференционные фильтры применяют для выделения определенного спектрального диапазона в случаях, когда не требуется регистрации спектров.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные средства монохроматизации, применяемые в микроскопии?
2. По каким характеристикам разделяют интерференционные фильтры?
3. Какие оптические и механические детали и узлы входят в состав монохроматора?
4. Чем отличается полихроматор от монохроматора?

Глава 12. ЛАЗЕРНЫЕ МИКРОСКОПЫ

Применение в микроскопии лазеров в качестве источника света привлекало исследователей практически с момента появления промышленных образцов (см. Приложение 2). Лазер дает почти монохроматический параллельный пучок лучей, обладающий большой интенсивностью, позволяя тем самым обойтись без фильтров или спектрального прибора. Однако попытка использовать лазерное излучение для получения изображения при освещении по методу Кёлера не увенчалась успехом из-за присущей лазерному излучению *когерентности*. Когерентность приводит к снижению разрешения [1] и неопределенности положения плоскости изображения при фокусировке объектива, а также к появлению спеклов, бликов и т.п. Снижение когерентности с помощью специальных оптических средств (например, волоконных дисков) оказалось нецелесообразным. Только развитие техники сканирования и компьютерных технологий позволило использовать лазер в микроскопии для получения изображений. Такие микроскопы называют лазерными сканирующими микроскопами. Рассмотрим два типа лазерных микроскопов – рамановский и конфокальный.

12.1. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия) предназначена для исследования способности атомов и различных молекулярных структур рассеивать монохроматическое излучение с изменением его частоты. В спектре рассеянного света обнаруживают отсутствовавшие в возбуждающем свете линии, число и расположение которых тесно связано с молекулярным строением вещества и имеет определенные особенности [44].

1. Спектр комбинационного рассеяния представляет собой систему линий-спутников, расположенных симметрично относительно несмещенной (рэлеевской) линии, частота которой совпадает с частотой возбуждающего света ν . Каждому спутнику с частотой $(\nu - \nu_i)$ («красный», или стоксов спутник) соответствует «фиолетовый», или антистоксов спутник с частотой $(\nu + \nu_i)$.

2. Разность между частотой линии комбинационного рассеяния и частотой возбуждающего света не зависит от последней и по абсолютной величине равна одной из собственных частот колебаний молекулы ν_i . Это позволяет по частотам линий комбинационного рассеяния (рамановских линий) находить частоты колебаний молекулы, проявляющихся в инфракрасном спектре.

3. Интенсивность рамановских линий, как правило, мала. В лучшем случае интенсивности наиболее сильных линий в спектре

комбинационного рассеяния составляют 10^{-5} – 10^{-6} от интенсивности возбуждающей линии, а слабые линии могут иметь интенсивности еще на несколько порядков меньше.

Использование лазеров позволяет значительно снизить количество вещества, необходимого для возбуждения линий комбинационного рассеяния. В 1975 году французским ученым М. Деле (M. Delhaye) и его сотрудниками был создан прибор, представляющий собой соединение микроскопа и спектрометра комбинационного рассеяния [44].

12.1.1. Принцип работы рамановского микроспектрометра

Лазер как будто специально создан для возбуждения спектров комбинационного рассеяния, позволяя избавиться от монохроматора и ртутной лампы. Лазерный луч фокусируют в точку на объекте, и именно из этой точки получают спектральную информацию.

На рис. 12.1. представлена принципиальная оптическая схема лазерного микроспектрометра, предназначенного для регистрации рамановских спектров. Лазер 1 имеет одномодовый волоконный вывод 2, сохраняющий поляризацию излучения. Выходной торец волокна служит источником света и устанавливается на оптической оси микроскопа. С помощью системы линз 3 (расширителя лазерного луча) лазерный луч преобразуется в параллельный пучок и после отражения от светоделительной пластинки 4 равномерно заполняет зрачок объектива 5. В результате осветительная система формирует на объекте 6 изображение источника в виде картины Эйри, размер и качество которой зависят от длины волны лазера, апертуры объектива и его абберрационных характеристик. В приборе применяют объектив с тубусом «бесконечность».

Настройка микроскопа, поиск и установка исследуемой структуры осуществляется традиционным способом. Освещение по Кёлеру настраивают с помощью осветительной системы проходящего (или отраженного) света 10-12 с лампой накаливания 13. Выбранную структуру объекта устанавливают в центре поля зрения и выключают лампу накаливания.

Излучение, рассеянное структурой, фокусируется объективом 5 и тубусной линзой 7 на входной щели монохроматора 8. После монохроматора спектр комбинационного рассеяния регистрируют с помощью приемника излучения 9.

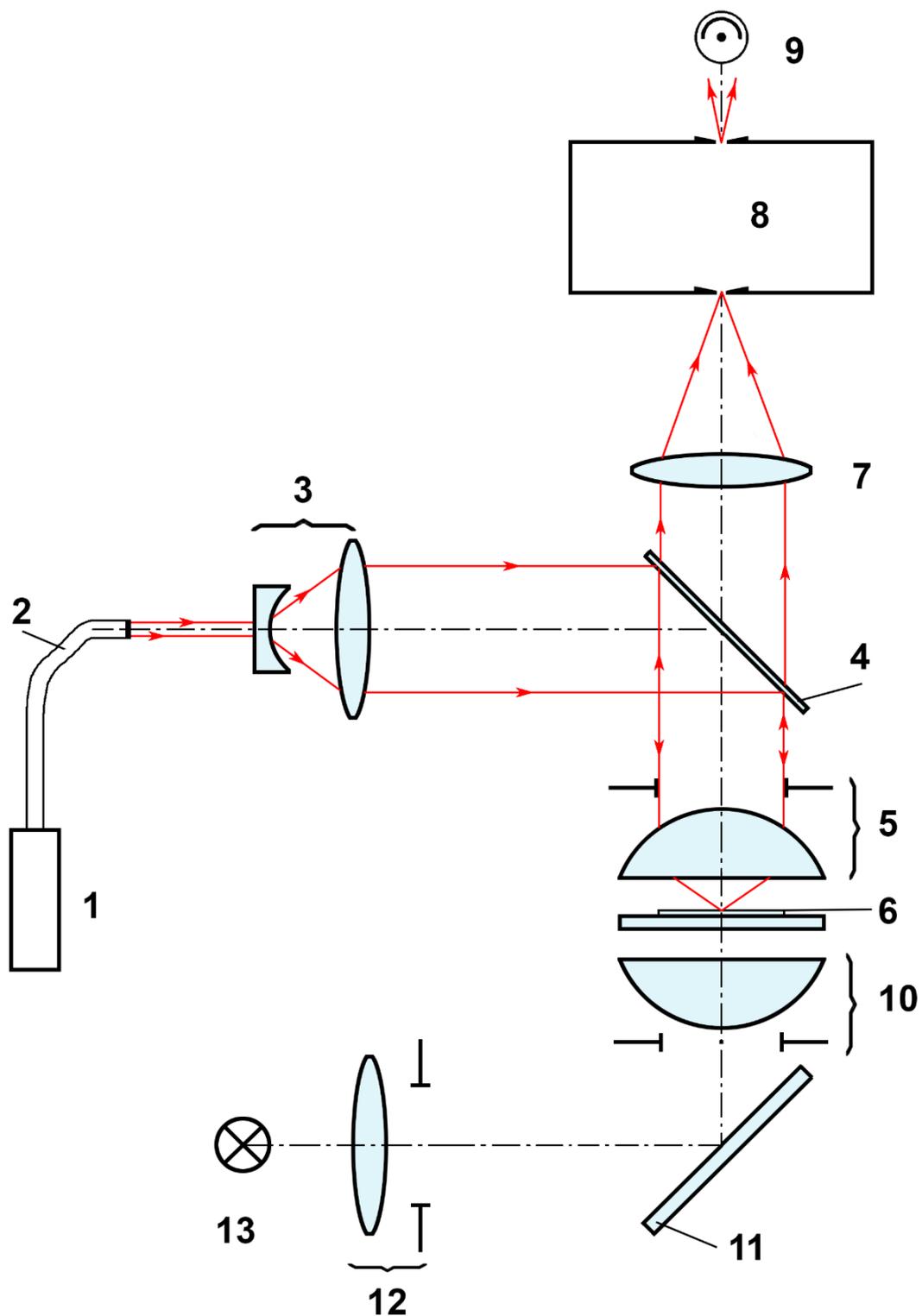


Рис.12.1. Принципиальная оптическая схема рамановского микроспектрометра.
 1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – светоделительная пластинка; 5 – объектив; 6 – препарат; 7 – тубусная линза; 8 – монохроматор; 9 – приемник излучения; 10 – конденсор; 11 – поворотное зеркало; 12 – коллектор; 13 – лампа накаливания.

12.1.2. Рамановский микроспектрометр

Интенсивность рамановских линий настолько мала, что даже относительно слабая нерегулярная внешняя засветка создает маскирующий фон. Поэтому конструкцию прибора максимально защищают от внешних засветок специальными светозащитными кожухами. На рис. 12.2. представлен внешний вид рамановского микроспектрометра «inVia» Renishaw (Англия) с закрытыми кожухами, а на рис. 12.3. этот же прибор представлен с открытым кожухом, внутри которого расположен микроскоп. Кожух открывается только для установки препарата на столике микроскопа, настройки его изображения и поиска исследуемой структуры. Во время регистрации спектра кожух закрывается, как показано на рис. 12.2.



Рис. 12.2. Рамановский микроспектрометр «inVia» Renishaw (Англия).

Кроме того, рамановский микроспектрометр должен иметь низкий уровень рассеянного лазерного излучения внутри самого прибора. Это связано с тем, что интенсивность возбуждающего лазерного излучения на 5-7 порядков выше интенсивности рамановских линий. В результате даже относительно слабое рэлеевское рассеяние возбуждающего света создает фон, особенно сильный в области самой возбуждающей линии. Из-за этого фона в области спектра около 100 см^{-1} от возбуждающей линии исследование рамановских линий бывает затруднительным.

Для снижения фона вблизи возбуждающей линии применяют двойные монохроматоры с голографическими дифракционными решетками (см. гл. 11), а в качестве светоделиителя – специальный узкополосный голографический фильтр (notch-filter).



Рис. 12.3. Рамановский микроспектрометр «inVia» Renishaw (Англия) с открытым кожухом.

Рамановский спектр позволяет исследовать химический состав и кристаллическую структуру объекта, а применение микроскопа – локализовать эти исследования на участках образца, равных диску Эйри. На рис. 12.4. представлен спектр комбинационного рассеяния графена, полученного расщеплением природного графита. Две рамановские линии, расположенные на расстоянии, превышающем 1500 см^{-1} от возбуждающей линии, значительно превышают уровень шума и уверенно регистрируются прибором.

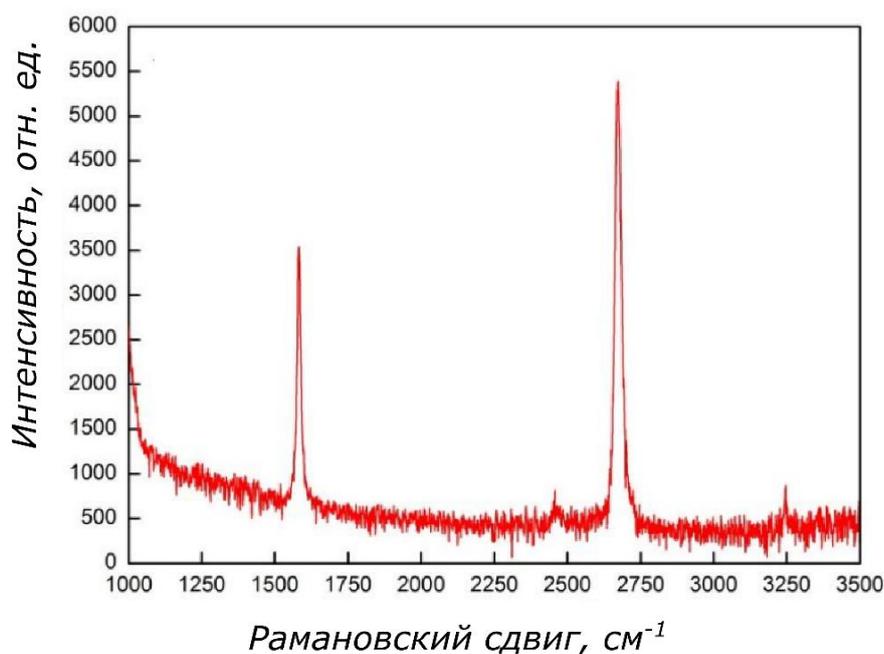


Рис. 12.4. Спектр комбинационного рассеяния графена, полученного расщеплением природного графита, аргонный лазер 488 нм [45].

Рамановская спектроскопия является инструментом для проведения анализа химического и фазового состояния различных объектов. Однако представленная модель прибора не позволяет получать изображение объекта в лазерном свете. Для получения изображения необходимо использовать технику сканирования.

12.2. Лазерный сканирующий конфокальный люминесцентный микроскоп

Традиционный оптический микроскоп работает совместно с глазом, и через окуляр исследователь видит изображение объекта. Конфокальный микроскоп выполняет некоторые функции зрительного анализатора человека, и, благодаря приемно-регистрирующей системе, исследователь видит воссозданное по точкам увеличенное изображение объекта на экране монитора.

Таким образом, лазерный сканирующий конфокальный микроскоп предназначен для получения изображения объекта с высоким контрастом и разрешением. Под действием лазера 1 в микроскопе 2 происходит взаимодействие его излучения с объектом, и результат этого взаимодействия регистрируется приемником 3 (рис.12.5.). Электрический сигнал приемника сначала преобразуется в аналогово-цифровую форму, а затем из цифровой формы опять в аналоговую для вывода оптического сигнала на экран монитора 7. В результате глаз видит изображение объекта на экране монитора.

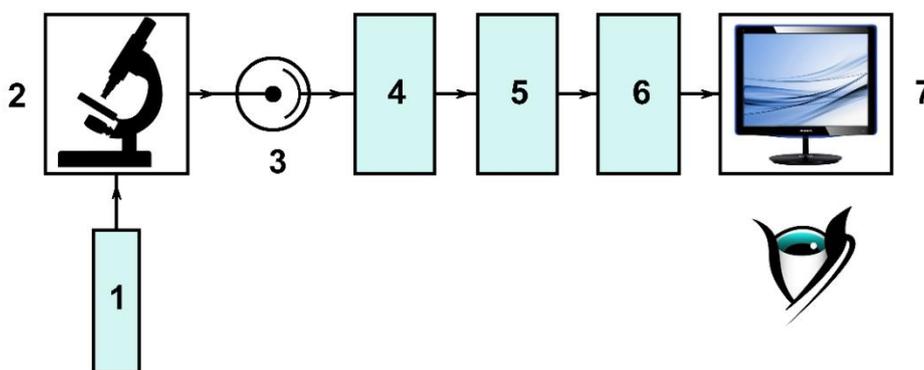


Рис. 12.5. Преобразование сигналов в конфокальном микроскопе.

1 – лазер; 2 – микроскоп; 3 – приемник излучения; 4 – аналогово-цифровой преобразователь; 5 – компьютер; 6 – цифровой аналоговый преобразователь; 7 – монитор.

12.2.1. Принципиальная оптическая схема

На рис. 12.6. представлена принципиальная оптическая схема прямого люминесцентного конфокального микроскопа, в которой ход лучей показан условно. Излучение лазера 1 с волоконным выводом 2

равномерно заполняет зрачок объектива 6 с помощью системы линз 3 (расширителя лазерного луча) и интерференционной светоделительной пластинки 4. В плоскости объекта 7 сфокусированный лазерный луч представляет собой картину Эйри, в которой размер и распределение энергии зависят от длины волны лазера 1 и характеристик объектива 6. Под действием лазерного излучения объект флуоресцирует и свет флуоресценции фокусируется тем же объективом 6 и тубусной линзой 9 в плоскость изображения 11 также в виде картины Эйри. Длина волны возбуждающего излучения меньше длины волны флуоресценции ($\lambda_{\text{воз}} < \lambda_{\text{фл}}$), поэтому такое же соотношение будет между диаметрами дисков Эйри. Интерференционная светоделительная пластинка 4 и запирающий фильтр 8 не пропускают рассеянное лазерное излучение.

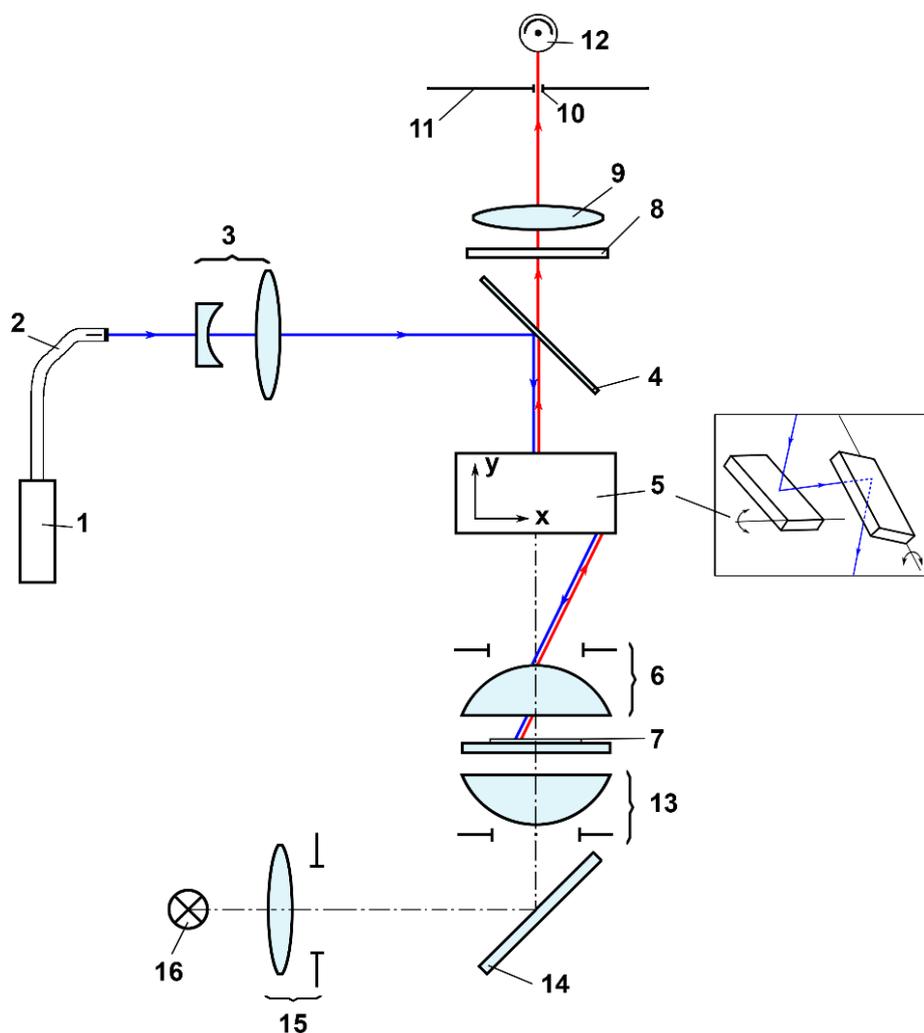


Рис. 12.6. Принципиальная оптическая схема прямого конфокального микроскопа.

1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – интерференционная светоделительная пластинка; 5 – системы сканирования по осям XY; 6 - объектив; 7 – препарат; 8 – запирающий светофильтр; 9 – тубусная линза; 10 – конфокальная диафрагма; 11 - плоскость изображения; 12 – приемник излучения (ФЭУ); 13 – конденсор; 14 – поворотное зеркало; 15 – коллектор; 16 – лампа накаливания.

В плоскости изображения 11, которая сопряжена с плоскостью объекта 7, располагается так называемая конфокальная диафрагма (pinhole) 10. В результате приемник 12 регистрирует только тот свет флуоресценции, который проходит через эту полевую диафрагму, диаметр которой устанавливает исследователь.

Настройка микроскопа осуществляется традиционным способом: освещение по Кёлеру настраивают с помощью осветительной системы проходящего света 13-15 с лампой накаливания 16.

Эта схема отличается от схемы рамановского микроспектрометра (см. рис.12.1.) наличием системы сканирования 5 по осям ХУ (пластинки сканера показаны условно, а оси ХУ направлены перпендикулярно оптической оси микроскопа). Кроме того, вместо монохроматора в плоскости изображения 11 помещена конфокальная диафрагма 10.

Поскольку сфокусированный лазерный луч облучает только одну точку объекта, то в каждый момент времени облучаемая и изображаемая точки (точка на объекте и точка в плоскости изображения) оказываются расположенными на сопряженных плоскостях. Такой ход лучей называют конфокальным, т.е. «софокусным».

12.2.2. Получение изображения и процесс сканирования

Получение изображения объекта 7 (рис. 12.6.), находящегося в фокальной плоскости объектива 6 (тубус объектива «бесконечность»), требует выполнить следующие действия:

- осуществить линейное сканирование объекта сфокусированным лазерным лучом по осям ХУ;
- последовательно регистрировать флуоресцентное изображение каждой точки объекта с помощью приемника (например, ФЭУ);
- осуществить цифровое преобразование информации, содержащейся в сигналах ФЭУ;
- сформированный в компьютере банк данных попиксельно перенести с цифрового преобразователя на экран монитора.

В традиционных микроскопах изображение получают со всех точек объекта одновременно. В конфокальном микроскопе изображение воссоздают по точкам при сканировании структур объекта в определенной последовательности. Процесс сканирования может осуществляться двумя способами: перемещением лазерного луча по поверхности неподвижного объекта или перемещением объекта относительно неподвижного луча (см. главу 10).

Рассмотрим процесс получения изображения на примере конфокального люминесцентного микроскопа, в котором сканирование осуществляют лазерным лучом при неподвижном объекте. Размер и

распределение интенсивности лазерного пятна, сканирующего объект, а, следовательно, ширину линии сканирования, определяют:

- длина волны лазера;
- оптические компоненты осветительной системы, от которых зависит распределение освещенности зрачка объектива;
- параметры объектива (числовая апертура и аберрации).

Величина регистрируемого сигнала зависит от размера конфокальной диафрагмы, которая представляет собой маленькую полевую диафрагму. При выбранном размере этой диафрагмы оптический сигнал можно повысить только за счет увеличения интенсивности лазерного луча.

Для получения информации со сканируемой площади объекта необходимо провести лазерный луч по этой площади. В результате сканирование объекта состоит из следующих этапов:

- Линейное сканирование (*цикл сканирования*) - высокая постоянная скорость движения лазерного возбуждающего пятна по оси X и регистрация света флуоресценции.
- Кадр сканирования (*рабочий цикл системы*) – обеспечение интервала между каждым последующим линейным сканированием, при котором оптический сигнал не регистрируется (*мертвый ход*). Кадр представляет собой чередование регистрируемых линейных сканирований с нерегистрируемыми интервалами между ними.
- Постоянная интенсивность лазерного луча в течение времени получения кадра (в течение всего рабочего цикла системы). Это требование связано с условием, что изменение оптического сигнала, направляемого в приемник, зависит только от свойств объекта при неизменной интенсивности возбуждающего света. Осуществляется за счет равномерного освещения расширенным лазерным лучом выходного зрачка объектива. Стабильность освещенности зрачка зависит от стабильности лазерного излучения (его шумов), параметров осветительной системы и системы сканирования.
- Обеспечение гибкости настройки различных режимов сканирования (изменение скорости сканирования и размера кадра). Это требует минимальной инерции подвижных компонентов системы сканирования.

В сканирующей системе используют два зеркала, колеблющихся с большой скоростью, каждое из которых приводится в движение двумя гальванометрическими двигателями (рис. 12.7.). Луч лазера 1 зеркалом 3 отклоняется по оси X , а зеркалом 2 – по оси Y . Такая система может генерировать быстрые и медленные движения луча для формирования полного двумерного изображения [3].

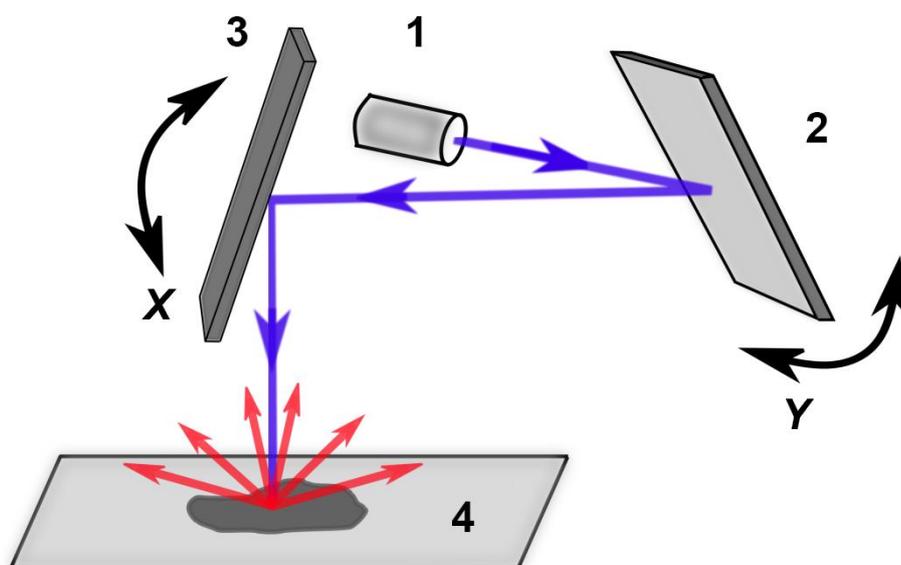


Рис. 12.7. Принципиальная схема сканирования двумя зеркалами.

1 – лазер; 2, 3 – зеркала; 4 – препарат.

Свет флуоресценции объекта на препарате 4 собирается объективом и направляется через сканирующую систему по тому же пути (коаксиальному), что и возбуждающий свет. При этом после светоделительной пластинки 4 (рис. 12.6.) положение сфокусированного флуоресцентного света в конфокальной диафрагме 10 остается постоянным и изменяется только по интенсивности. Информация о структуре объекта содержится именно в изменениях интенсивности света флуоресценции, прошедшего через конфокальную диафрагму.

Равномерность освещенности поля сканирования (кадра) зависит от конструктивных особенностей и юстировки сканирующего устройства, а также от характеристик объектива и осветительной системы. Чем меньше площадь кадра, тем выше равномерность, что особенно важно при проведении фотометрических исследований. Неравномерность освещенности может возникнуть в том случае, когда препарат (или плоскость предметного столика) расположен не параллельно плоскости сканирования.

12.2.3. Предел разрешения в плоскости изображения

Конфокальный микроскоп представляет собой оптико-электронный прибор, поэтому его разрешающая способность складывается из оптической и «электронной». Оптическая составляющая зависит от абберационных характеристик оптики (в основном объектива), настройки оптико-механической части прибора и параметров лазера. «Электронная» составляющая зависит от процесса сканирования, размера конфокальной

диафрагмы и дальнейшего преобразования сигнала из одной формы в другую (см. рис. 12.5.).

Разрешающая способность - это минимальное расстояние между двумя одинаковыми точками объекта, которые прибор различает как отдельные структуры. В конфокальном микроскопе разрешающую способность прибора подразделяют на латеральную (в плоскости XU , перпендикулярной оптической оси системы) и аксиальную (в направлении оптической оси Z). Рассмотрим латеральную составляющую предела разрешения конфокального микроскопа и сравним ее с разрешением традиционного микроскопа.

На рис. 12.8.а. представлены одинаковые точечные источники света 1 и 2, расположенные в плоскости объекта вблизи оптической оси на малом расстоянии друг от друга. Эти источники могут быть либо когерентными, либо некогерентными. В традиционном микроскопе пределы разрешения когерентных и некогерентных точечных источников будут различными [1]. Если они некогерентные, тогда их изображения 1' и 2' представляют собой результат сложения интенсивностей двух дисков Эйри (рис. 12.8.б.), а предел разрешения $d_{\text{неког.}}$ соответствует выражению:

$$d_{\text{неког.}} = 0,61\lambda/A,$$

где λ – длина волны; A – апертура объектива. Если точечные источники когерентные, тогда в плоскости изображения следует складывать амплитуды световых колебаний с учетом фаз, а затем определять квадраты амплитуд. В этом случае предел разрешения $d_{\text{ког}}$ соответствует выражению:

$$d_{\text{ког}} \approx 0,9\lambda/A$$

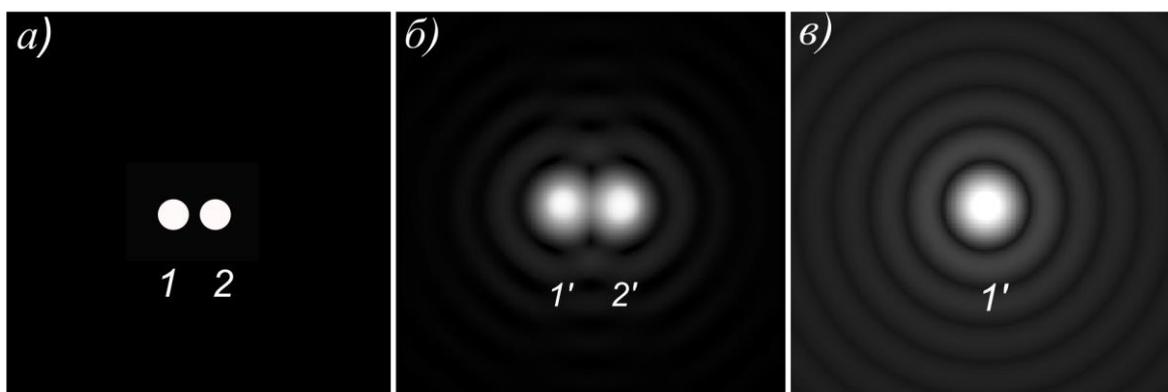


Рис. 12.8. Изображения двух близко расположенных точечных источников света (а) в плоскости изображения традиционного (б) и конфокального (в) микроскопов.

В конфокальном микроскопе для возбуждения флуоресценции двух малых частиц, например, частиц флуоресцентного красителя, выполняющих роль точечных источников света 1 и 2, используют лазер, т.е. когерентный источник света. Однако, благодаря линейному сканированию, частицы 1 и 2 возбуждаются не одновременно, а

последовательно, и, следовательно, свет, излучаемый одной из них, не интерферирует со светом, излучаемым другой. В некоторый момент времени t лазерный луч ($\lambda_{\text{воз}}$) возбуждает частицу 1, на которую он фокусируется объективом в виде картины Эйри (диаметр диска Эйри $d_{\text{воз}} = 1,22\lambda_{\text{воз}}/A$). Этот же объектив создает изображение частицы 1 в свете флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}}$) в плоскости изображения (рис. 12.8.в.). Изображение также представляет собой картину Эйри диаметром $d'_{\text{фл}} = 1,22\nu_{\text{об}}\lambda_{\text{фл}}/a$, где $\nu_{\text{об}}$ – увеличение объектива. Изображение 2' появится через некоторый промежуток времени ($t + \Delta t$). Благодаря такой схеме прибора, в каждый момент времени в плоскость изображения проецируется только одно изображение частицы, которое, кроме того, совмещено с конфокальной диафрагмой. В этом случае предел разрешения этих двух частиц зависит не только от параметров оптической системы микроскопа, но и от характеристик сканирующего устройства и обработки сигналов приемника излучения. На рис. 12.9. представлена полученная после преобразования светового сигнала в электрический аналоговая кривая от этих двух точек, разрешение которых зависит от величины провала между максимумами.

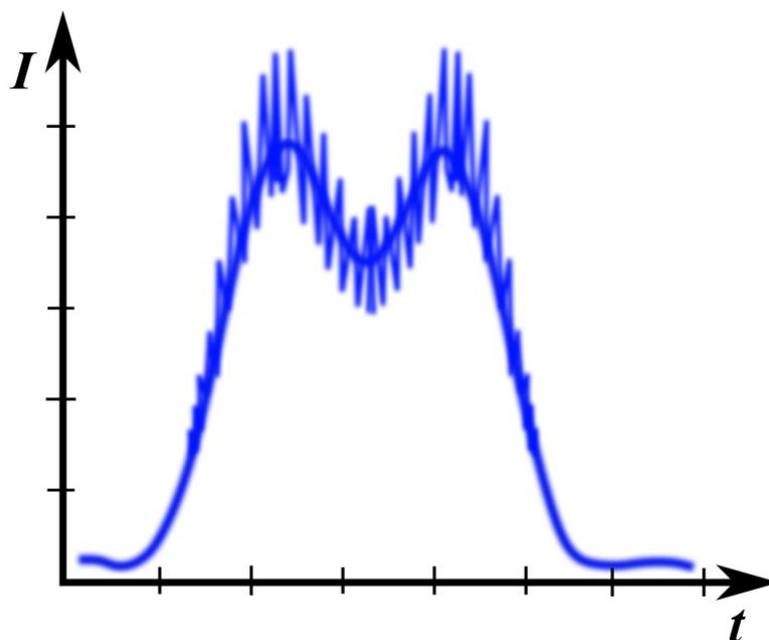


Рис. 12.9. Кривая зависимости интенсивности I двух точек от времени t линейного сканирования.

При сканировании двух точечных объектов минимальное расстояние между ними, необходимое для разделения дисков Эйри, в цифровом изображении составляет $0,25 \times d_{\text{Эйри}} = 1,22\lambda/4a$. В противном случае часть информации будет утеряна [46].

Теоретически разрешающая способность конфокального микроскопа всего в 1,4 раза превышает разрешение традиционного

микроскопа при бесконечно малом диаметре конфокальной диафрагмы, что практически невозможно реализовать из-за шумов системы [46].

12.2.4. Конфокальная диафрагма и толщина оптического среза

По изображению, полученному в традиционном микроскопе, иногда трудно разобрать, находятся ли структуры рядом или одна под другой. В конфокальном микроскопе для воссоздания объемного расположения структур необходимо получить серию «оптических срезов» с последующей реконструкцией с помощью специальной компьютерной программы.

Рассмотрим препарат, толщина которого превышает толщину, необходимую для получения качественного изображения в традиционном микроскопе. На рис. 12.10. представлена оптическая схема конфокального микроскопа, поясняющая принцип получения «оптических срезов». Препарат 6 установлен на сканирующем пьезо-столике 7, который его перемещает вдоль оптической оси Z . Однако перемещение и шаг сканирующего столика должны соответствовать параметрам объектива, поэтому их задает экспериментатор. Объектив 5 фокусируется на структуру (красного цвета) малого размера, расположенную в плоскости FF . Он создает изображение этой структуры в виде картины Эйри в плоскости изображения 10 (плоскости XY). В этой плоскости расположена конфокальная диафрагма, размер которой установлен равным диаметру диска Эйри. Приемник 11 (ФЭУ) регистрирует только излучение, прошедшее через конфокальную диафрагму.

Пусть на расстояниях $+f$ и $-f$ по оси Z расположены две малые структуры (синего цвета), свет флуоресценции которых также направляется после объектива 5 на плоскость 10, но в виде расфокусированных пятен. Диаметры пятен тем больше, чем дальше структуры отстоят от плоскости FF . Вклад от них в сигнал, регистрируемый приемником 11, тем меньше, чем больше отношение площадей расфокусированных пятен к площади конфокальной диафрагмы. В результате размер конфокальной диафрагмы оказывает влияние на толщину слоя $2f$ (толщину оптического среза), с которого приемник регистрирует оптический сигнал. Однако, главным образом, толщина среза зависит от апертуры объектива и его характеристик, а, кроме того, на него влияют длина волны и показатель преломления среды, в которую погружен объект. Таким образом, чем меньше диаметр диафрагмы, тем тоньше «оптический срез». Структуры, находящиеся вне оптического среза, не видны на изображении среза, поэтому конфокальный микроскоп можно считать системой, способной исследовать объект в трех измерениях. Кроме того, контраст изображения

увеличивается за счет блокирования конфокальной диафрагмой рассеянного в препарате света.

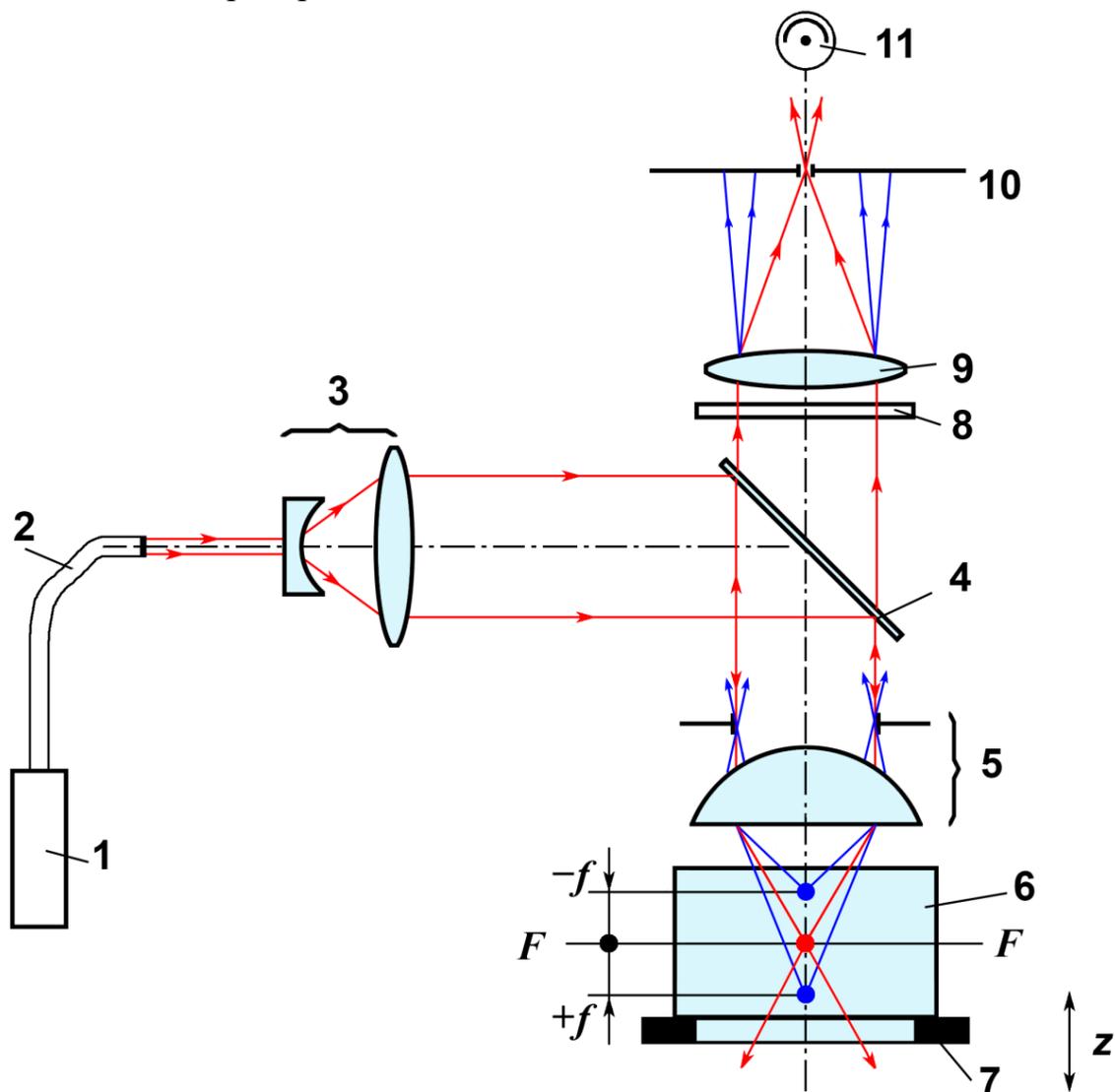


Рис. 12.10. Принципиальная оптическая схема конфокального микроскопа при сканировании вдоль оптической оси Z.

1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – светоделительная пластинка; 5 – объектив; 6 – препарат; 7 – сканирующий столик (пьезо-столик); 8 – запирающий светофильтр; 9 - тубусная линза; 10 - плоскость изображения с конфокальной диафрагмой; 11 – приемник излучения.

Итак, размер конфокальной диафрагмы напрямую влияет на аксиальное разрешение и толщину среза. Однако при ее уменьшении уменьшается световой поток, попадающий на фотоприемник. В результате разрешающая способность становится зависимой от электронных систем, преобразующих оптический сигнал в аналоговый электрический, а затем и в цифровой. Эти преобразования могут ухудшить разрешение [47].

12.2.5. Влияние шумов лазеров и приемно-регистрирующей системы

Приемник излучения имеет линейный участок регистрации полезного сигнала, за пределами которого будут наблюдаться искажения отношения интенсивности оптического сигнала к яркости изображения на экране монитора. На интенсивность регистрируемого оптического сигнала влияют характеристики объектива, мощность излучения лазера, настройка прибора, спектральная чувствительность приемника и т.д. Поэтому уровень регистрируемого сигнала обязательно должен находиться в пределах линейного участка его чувствительности [47].

В приемно-регистрирующей системе существуют случайные флуктуации сигнала (шумы), имеющие разнообразную физическую природу (квантовую, тепловую и т.д.). Чем меньше уровень шумов, тем больше отношение *сигнал/шум*, и выше качество изображения.

Высокочастотные шумы (шумы, у которых постоянная времени сравнима с временем сканирования одного пиксели – *pixel time*) проявляются на изображении в виде ярких или темных точек размером в 1-2 пикселя. Источниками таких шумов являются шумы лазера, фотоприемников, электронных блоков, волоконно-оптические кабелей и т.п. Низкочастотные шумы проявляются на изображении как горизонтальные полосы. Эти шумы могут возникать из-за наводок по электрической сети, вибраций и т.д.

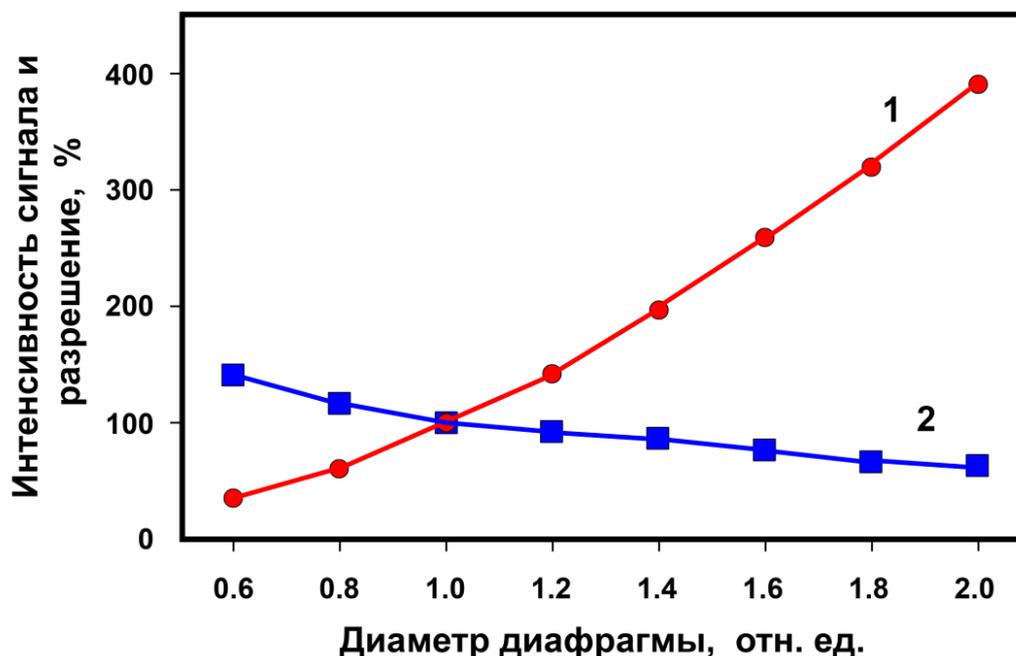


Рис. 12.11. Экспериментальные кривые зависимости интенсивности сигнала и аксиального разрешения от диаметра конфокальной диафрагмы (объектив 63x/1.32 масляной иммерсии) [47].

- 1 - зависимость интенсивности сигнала от диаметра конфокальной диафрагмы;
- 2 - зависимость аксиального разрешения от диаметра конфокальной диафрагмы.

Уровень высокочастотных шумов в значительной степени зависит от напряжения, подаваемого на фотоприемник. Поэтому напряжение следует устанавливать на возможно более низком уровне путем регулирования мощности лазера. В результате оптимальное соотношение между величинами светового сигнала и отношением *сигнал/шум* достигается в том случае, когда диаметр конфокальной диафрагмы становится равным диску Эйри, что подтверждается экспериментальными данными [47]. На рис. 12.11. приведены экспериментальные кривые зависимости интенсивности сигнала от диаметра конфокальной диафрагмы (красная кривая 1) и зависимости аксиального разрешения (разрешение вдоль оси *Z*) от диаметра конфокальной диафрагмы (синяя кривая 2). Диаметр диафрагмы, равный диаметру Эйри, принят за единицу. Из рисунка видно, что оптимальное соотношение *сигнал/шум* и разрешения наступает именно при диаметре диафрагмы, равном единице.

Уменьшить влияние шума возможно за счет усреднения изображения при сканировании по нескольким линиям или кадрам. Поскольку шумы имеют случайное распределение по изображению, меняющееся от кадра к кадру, то их величина будет уменьшаться с увеличением числа усредняемых линий или кадров, а полезный сигнал при этом остается неизменным. Необходимое число кадров подбирает экспериментатор, наблюдая за изменением изображения после очередного сканирования. Если изображение перестает изменяться, то это означает, что достигнуто необходимое число усредняемых кадров. Излишнее число кадров приводит к увеличению времени сканирования, выгоранию препарата, а также повреждению живых объектов [47].

12.2.6. Серия срезов

Получение серии «оптических срезов» является одним из основных достоинств конфокальной микроскопии, так как они позволяют детально исследовать объемную структуру объекта. Количество срезов и расстояние между ними выбирают в зависимости от толщины объекта, разрешающей способности прибора и задачи исследования. Для проведения объемной реконструкции или получения ортогональных проекций количество срезов должно быть таким, чтобы на изображении не проявлялась дискретность структуры (например, 30 – 100 срезов). При этом шаг выбирают равным или немного меньшим, чем аксиальная разрешающая способность объектива. Начало и конец серии срезов устанавливает исследователь. На рис. 12.12. представлена серия оптических срезов (*Z*-серия) и трехмерная модель объекта, созданная с помощью специальной программы.

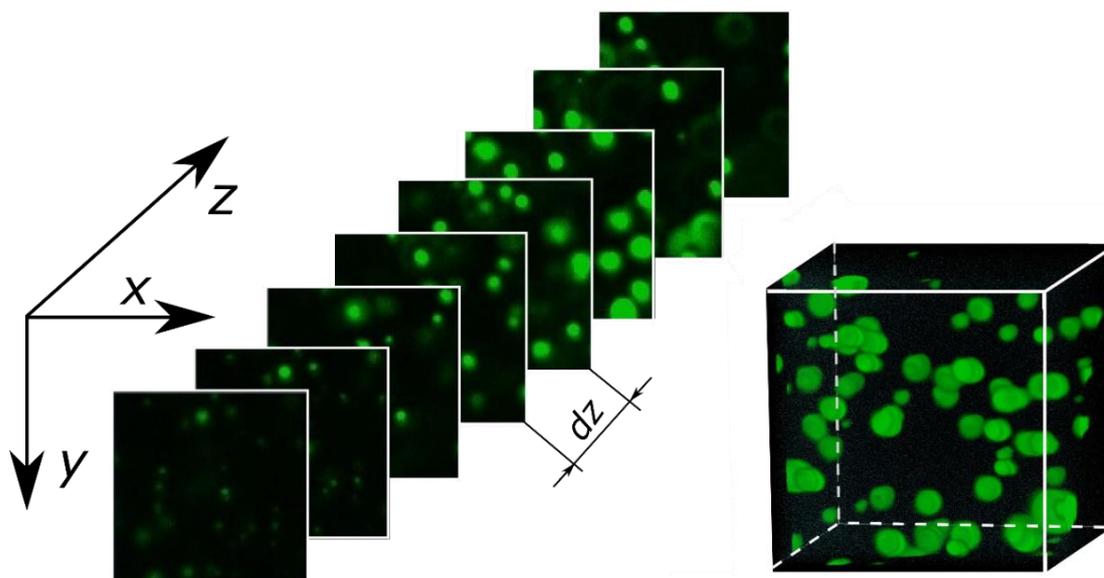


Рис. 12.12. Серия Z-срезов и объемная реконструкция квантовых точек CdSe/ZnS в пленке из поликарбоната, длина волны возбуждения $\lambda=405$ нм, объектив Fluor 20×0,75. dz – расстояние между соседними срезами.

Общая толщина серии срезов ограничивается рабочим расстоянием объектива. Например, рабочее расстояние объектива 63×1,32 масляной иммерсии составляет всего 70 мкм. Кроме того, общая толщина срезов зависит от величины поглощения в толще объекта как возбуждающего, так и света флуоресценции. Для снижения этого эффекта необходимо либо уменьшать концентрацию красителя, либо использовать краситель с другими спектральными характеристиками возбуждения и флуоресценции [47].

12.2.7. Подготовка препарата

Конфокальный микроскоп создан на базе традиционного люминесцентного (прямого или инвертированного) микроскопа с сохранением всех его функций. Следовательно, подготовка препарата для конфокальной и традиционной микроскопии подчиняется одинаковым требованиям. Например, предварительно окрашенный соответствующим флуоресцентным красителем (или обладающий собственной флуоресценцией) объект располагают на стандартном предметном стекле. Объекты делятся на фиксированные и живые. К живым объектам относятся клетки в питательном растворе. Толщина объекта, среда, в которую он заключен, наличие или отсутствие покровных стекол зависят от типа объекта (срез ткани, мазок, отдельные структуры, живые клетки и т.п.), задачи исследования и характеристик объектива [1]. Иными словами, для конфокальной микроскопии используют препараты, приготовленные так же, как и для традиционной. Конфокальный микроскоп имеет преимущество перед традиционным в том случае, когда

толщина объекта превышает толщину, необходимую для получения качественного изображения, а приготовление более тонких срезов затруднено или даже невозможно без потери информации или повреждения объекта, например, в случае живых клеток.

Конфокальный флуоресцентный метод применяют к объектам, тонкая структура которых, как правило, имеет нитевидную или точечную форму (биологические клетки, а не сплошные и плотные ткани, например, кожа) [46]. Именно к такому типу объектов относятся рассуждения, связанные с разрешающей способностью конфокального флуоресцентного микроскопа для исследования внутренней структуры или формы.

Однако толщина объекта может быть ограничена свойствами самого объекта. Создание объемной реконструкции объектов, обладающих большим поглощением или рассеянием света в толще препарата, вызывает трудности. Кроме того, если размер структур объекта меньше 0,2 мкм, а нам необходимо не только его обнаружить, но и получить изображение этих структур, то следует применять другие методы, например, электронную микроскопию [47]. Исследования спектральных характеристик объектов возможны в том случае, когда система конфокального микроскопа построена по принципу спектрофотометра (см. гл. 10 - 11).

12.2.8. Выбор объектива

В комплект объективов могут входить как универсальные, так и объективы, специально разработанные для конфокальной микроскопии. Основными параметрами объективов являются: увеличение, числовая апертура, длина тубуса (например, 160 мм и бесконечность), рабочее расстояние, тип коррекции аберраций (ахромат, апохромат, план-апохромат и т.п.), спектральный диапазон и пропускание. Объективы рассчитывают либо для работы с покровным стеклом определенной толщины, либо для работы без покровного стекла. Кроме того, объективы делят на «сухие» и иммерсионные (например, водной или масляной) [1].

Следует отметить, что в традиционной и конфокальной микроскопии аберрации одинаковой величины по-разному влияют на качество изображения. Если в традиционной микроскопии аберрации иногда вызывают незначительные дефекты изображения, то объективы с такими же аберрациями могут привести к существенным потерям или искажениям в конфокальной микроскопии, особенно при объемной реконструкции [3].

К сожалению, строгие оптические требования конфокальной микроскопии часто скрыты оптической системой, которая гарантирует четкое изображение, даже когда микроскоп работает неправильно. Кроме того, в традиционном микроскопе остаточные аберрации объектива

исправляют окуляр и адаптер фотонасадки. Конфокальные микроскопы фирма создает практически «под ключ». С помощью такого прибора даже начинающие микроскописты могут быстро получить «красивое» изображение без учета того, что результаты эксперимента существенно зависят от правильного выбора объектива, подготовки препарата и настройки оптической системы. Дело в том, что добавить информацию к изображению, которое сформировал объектив, не может ни один другой компонент прибора. Эти компоненты должны выполнять только корректирующие функции без потери или искажения полученной им информации.

В традиционной микроскопии при конкретных условиях наблюдения качество изображения зависит не только от характеристик объектива, но и от выполнения определенных требований к препарату (толщина объекта, наличие или отсутствие покровного стекла, среда и т.д.). В конфокальном микроскопе для получения изображения только в ХУ-плоскости к выбору объектива и подготовке препарата предъявляются такие же требования.

Как уже отмечалось, преимущество конфокальной микроскопии заключается в улучшении качества флуоресцентного изображения за счет уменьшения фона и возможность трехмерной реконструкции более толстых объектов. Однако получение объемных изображений приводит к дополнительным требованиям относительно выбора объектива и подготовки препарата.

Влияние сферической аберрации. Объектив формирует изображение с минимальным значением сферической аберрации только в том случае, если он работает в расчетных условиях [1]. К числу факторов, которые приводят к увеличению сферической аберрации, относятся:

- *нестандартная толщина покровного стекла*, которая особенно влияет на аберрации высокоапертурных «сухих» объективов, некоторые из которых оснащают специальным коррекционным кольцом; его необходимо установить согласно измеренной толщине покровного стекла; коррекционное кольцо изменяет расстояние между линзовыми компонентами объектива и тем самым осуществляет коррекцию сферической аберрации;
- *нестандартный показатель преломления иммерсионного масла*, находящегося между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом; объективы масляной иммерсии обычно оптимизированы для работы с покровным стеклом толщиной 0,17 мм с показателем преломления 1,53 и иммерсионным маслом с показателем преломления 1,52;
- *показатель преломления и качество среды*, в которой находится объект; сферическую аберрацию вносит слой среды между

покровным стеклом и объектом даже при использовании покровного стекла стандартной толщины; этот слой увеличивает эффективную толщину покровного стекла; кроме того, увеличение сферической аберрации может быть вызвано неоднородностью ее показателя преломления («кисель с комочками»);

- *среда крепления объекта и сам объект* (свойства и толщина) - любой нестандартный материал между объектом и поверхностью фронтальной линзы влияет на аберрационные характеристики, а, следовательно, на качество изображения; соблюдение расчетных требований особенно критично при высокой числовой апертуре объектива.

Перед началом исследования на конфокальном микроскопе необходимо сопоставить значения показателей преломления всех сред и их толщин - от объекта до фронтальной линзы объектива. Исторически сложилось так, что биологи первыми столкнулись с проблемой снижения качества трехмерного изображения живых клеток в водном растворе. Для уменьшения толщины среза они использовали высокоапертурный объектив масляной иммерсии. Однако показатели преломления субклеточного компонента и его окружающей среды оказываются меньше показателя преломления иммерсионного масла, а, кроме того, их величины в объеме препарата часто являются неоднородными. Даже в фиксированных препаратах показатель преломления среды, в которой находится объект, обычно не соответствует показателю преломления иммерсионного масла. В результате выяснилось, что возможности этих объективов не могут реализоваться в полной мере именно из-за несоответствия показателей преломления воды (1,33), иммерсионного масла (1,52) и покровного стекла (1,53). Несоответствие приводит к увеличению сферической аберрации, которая возникает на границе раздела стекло-вода и становится заметной уже на глубине 10 мкм. Причем величина сферической аберрации возрастает по мере увеличения номера среза. В каждом последующем срезе происходит снижение контраста и интенсивности сигнала из-за уменьшения света флуоресценции, прошедшего через конфокальную диафрагму, что приводит к потере яркости мелких деталей и искажению трехмерного изображения, особенно в нижних срезах.

Сухие объективы и объективы масляной иммерсии дают высокое качество изображения структур, находящихся непосредственно за покровным стеклом. На рис. 12.13. представлено последовательное изменение распределения интенсивности ФРТ (функции рассеяния точки) из-за сферической аберрации после перефокусировки объектива по оси Z вглубь препарата. При размере конфокальной диафрагмы, равной диску Эйри, она «пропустит» диск Эйри и «отрежет» кольца (рис. 12.13.а). При продвижении вглубь образца (рис. 12.13.б-г) происходит

перераспределение энергии в ФРТ, что приводит к увеличению интенсивности колец, уменьшению интенсивности регистрируемого сигнала и соответствующему снижению отношения *сигнал/шум*.

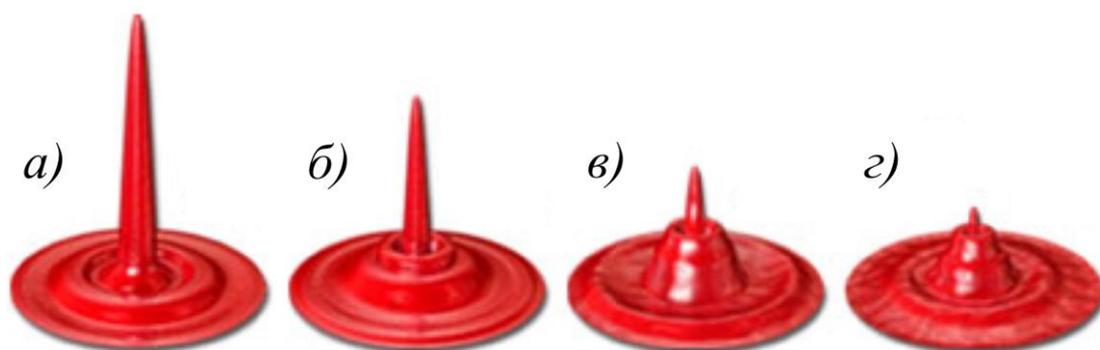


Рис. 12.13. Изменение распределения интенсивности функции рассеяния точки при последовательном увеличении сферической аберрации (слева направо) [3].

Интерес биологов к использованию методов конфокальной микроскопии при исследованиях живых клеток в водном растворе стал основным стимулом разработки высокоапертурных водо-иммерсионных объективов с большим рабочим расстоянием. Использование водо-иммерсионных объективов позволяет минимизировать увеличение сферической аберрации. Водные иммерсионные объективы с большим рабочим расстоянием дают возможность получать трехмерные изображения на глубинах более 200 $\mu\text{м}$. На рис. 12.14. представлен объектив водной иммерсии, разработанный специально для конфокальной микроскопии.

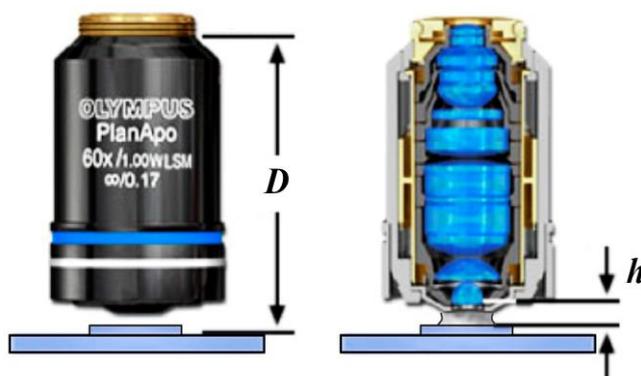


Рис. 12.14. Внешний вид и вид в разрезе объектива водной иммерсии $60\times 1,0$ с тубусом бесконечность, предназначенного для работы с покровным стеклом 0,17 мм (Olympus) [3].

D – высота объектива (парфокальность); h – рабочее расстояние.

Таким образом, дополнительная сферическая аберрация иммерсионных объективов становится минимальной только в том случае, когда близки между собой показатели преломления иммерсии, стекла, объекта и его среды. Сухие объективы дают высокое качество

изображения только верхнего среза объекта и последовательное снижение качества внутренних срезов.

Внеосевые (полевые) aberrации. Кома в основном заметна на изображениях точечных структур вдали от оптической оси, вызывая искажение их изображения в виде «запятых», размер которых увеличивается с увеличением расстояния от оси. При наличии *астигматизма* диск Эйри становится несимметричным, что также приводит к ухудшению изображения. Для уменьшения влияния полевых aberrаций следует уменьшать площадь сканирования.

Продольная хроматическая aberrация. Наличие продольной хроматической aberrации негативно сказывается на изображениях, полученных при окрашивании объекта двумя или более красителями с различными длинами волн флуоресценции. Хроматическая aberrация также приводит к искажениям трехмерного изображения.

Пропускание оптической системы. В некоторых ситуациях пропускание объектива важнее, чем другие его aberrационные характеристики, исправление которых требуют введения дополнительных линзовых компонентов и покрытий. Дополнительные компоненты приводят к уменьшению пропускания объектива. В результате высокая апохроматическая коррекция может привести к снижению возможности обнаружения слабо флуоресцирующих компонентов.

Спектральный диапазон. Объектив используют для фокусировки лазерного возбуждающего света и света флуоресценции объекта, поэтому применяют объективы-апохроматы, качество изображения которых соответствует теоретическому пределу разрешения в спектральном диапазоне 380 – 900 нм. Спектральный диапазон объектива определяют состав стекол, клея и покрытия, нанесенные на поверхности линз.

Чистота оптических поверхностей имеет очень важное значение, так как пыльная и грязная оптика приводит к увеличению рассеянного света и появлению на изображении пятен.

Изображение, воссозданное по сигналам фотоприемника, не передает цветовые соотношения объекта, а является черно-белым, как показано на рис. 12.15.а. Исследователь может «окрашивать» изображение согласно наблюдаемому в окуляр, либо по своему вкусу окрасить его в псевдоцвета, либо в соответствии со спектральными характеристиками красителя, например, в зеленый цвет (рис. 12.15.б.). На этих рисунках представлена трехмерная реконструкция Z-серии срезов (рис. 12.12.) с «сухим» объективом-флюаром 20×0,75. Объектив обладает высоким пропусканием и предназначен для работы без покровного стекла. Размер каждого среза (кадра) составляет 15×15 мкм, а размер поля зрения объектива – 1,15 мм. Это означает, что площадь кадра примерно в

6000 раз меньше площади поля зрения. Следовательно, объектив работает практически центром поля зрения с минимальными полевыми aberrациями.

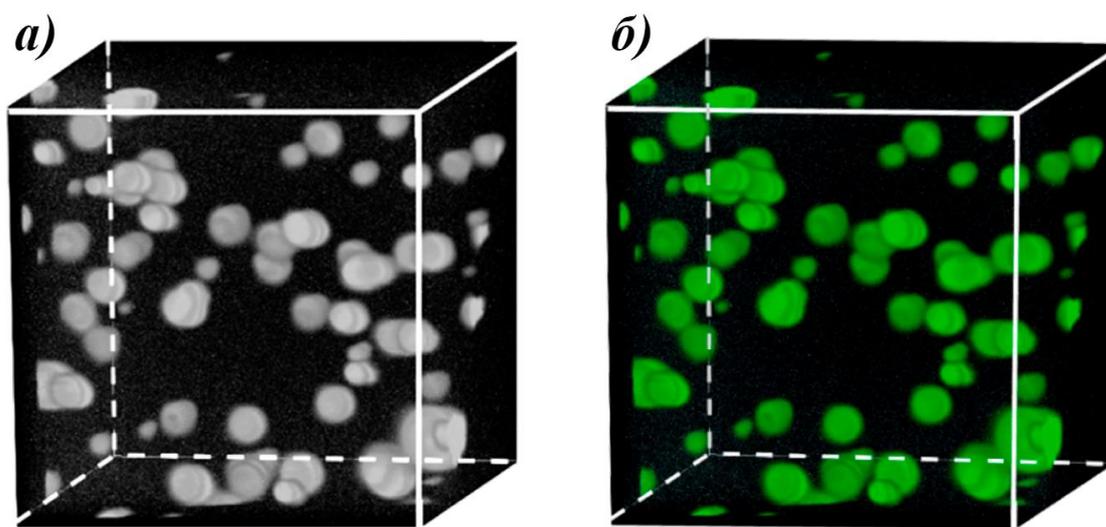


Рис. 12.15. Трехмерное неокрашенное изображение (а) и изображение, окрашенное в псевдоцвет (б), квантовых точек CdSe/ZnS в пленке поликарбоната, объектив 20×0,75.

Квантовые точки CdSe/ZnS размером 5 нм заключены в пленку поликарбоната с показателем преломления 1,6. Они флуоресцируют в зеленой области спектра ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ нм}$) при возбуждении $\lambda_{\text{воз}} = 405 \text{ нм}$. В плоскости первого от фронтальной линзы среза одиночная точка изображается в виде диска Эйри $d_{\text{фл}} = 1,22V\lambda/A = 1,22 \times 20 \times 0,53/0,75 = 17,2 \text{ мкм}$ при ее возбуждении в пределах диска $d_{\text{воз}} = 1,22\lambda/A = 1,22 \times 0,405/0,75 = 0,66 \text{ мкм}$. Если в пределах $d_{\text{воз}} = 0,66 \text{ мкм}$ находится не одна, а несколько квантовых точек, то они будут отличаться от изображения одиночной точки только интенсивностью. Значит, по форме изображения сложно судить о компоновке точек внутри изображения, но по интенсивности возможно судить о их количестве. Однако эта возможность снижается из-за увеличения сферической aberrации в последующих срезах. В данном случае для получения более качественного изображения желательно использовать объектив масляной иммерсии, показатель иммерсии которого близок к показателю преломления поликарбоната.

12.3. Конструкция конфокального микроскопа LSM 710

Устройство и принцип работы конфокального микроскопа рассмотрим на примере лазерного сканирующего люминесцентного конфокального микроскопа LSM 710 фирмы Carl Zeiss (Германия), созданного на базе традиционного микроскопа. Внешний вид этого традиционного микроскопа представлен на рис. 12.16.



Рис. 12.16. Прямой универсальный моторизованный микроскоп Axio Imager Z2m фирмы Carl Zeiss (Германия) [48].

В данной модели предусмотрено автоматизированное управление турелью со светоделительными кубиками, полевой диафрагмой, конденсором, перемещением столика с Z-приводом (диапазон перемещения 25 мм с шагом 10 нм), переключением режимов освещения, сменой объективов и др. Микроскоп позволяет проводить исследования как в отраженном свете (светлое и темное поле, поляризация, ДИК), так и в проходящем свете (светлое и темное поле, поляризация, ДИК). Документирование изображений производят с помощью цветной цифровой камеры AxioCam HRC. Камера дает возможность работать с высокой скоростью смены кадров и динамическим диапазоном 1:2500 для достижения максимальной цветопередачи и детализации изображения. При соответствующем программном обеспечении система документирования позволяет проводить обработку и анализ изображений.

На рис. 12.17. представлен внешний вид лазерного сканирующего люминесцентного конфокального микроскопа LSM 710. Оптическая и приемно-регистрирующая части прибора чувствительны к внешним вибрациям, поэтому все блоки питания, пульт управления, системные

блоки и монитор находятся за пределами специального антивибрационного стола. На этом столе установлена плита, на которую крепятся микроскоп и головка модуля сканирования. Прибор необходимо размещать в помещении с кондиционером для поддержания постоянной температуры и влажности.



Рис. 12.17. Лазерный сканирующий люминесцентный конфокальный микроскоп LSM 710 фирмы Carl Zeiss (Германия).

12.3.1. Компоновка оптических и регистрирующих устройств

На рис. 12.18. изображена схема компоновки оптико-механических и приемно-регистрирующих устройств конфокального микроскопа, состоящая из двух основных частей. Первая часть схемы содержит микроскоп Axio Imager Z1 с сохранением всех его основных функций. Настройка микроскопа происходит в проходящем свете с лампой накаливания 1 и возможностью применения методов темного поля и ДИК. Для наблюдения флуоресценции объектов в отраженном свете используют ртутную лампу 6. Объект 3 наблюдают через окуляр 5 или получают изображение с помощью цифровой камеры 7.

Вторая часть схемы – модуль сканирования. Благодаря бесконечной длине тубуса объектива 4 все оптические компоненты и приемники излучения, связанные с конфокальным режимом работы микроскопа, объединены в единой головке модуля сканирования. Лазерное излучение через одномодовое волокно попадает на систему интерференционных светоделителей 19. Система сканирования 10 осуществляет линейное

сканирование лазерным лучом и направляет свет флуоресценции на конфокальную диафрагму 13. Максимальная скорость сканирования составляет 8 кадров/сек. (512 × 512 пикселей). При сканировании светоделительный кубик с фильтрами выводится из хода лучей микроскопа. После конфокальной диафрагмы свет флуоресценции направляется в полихроматор 13 – 17.

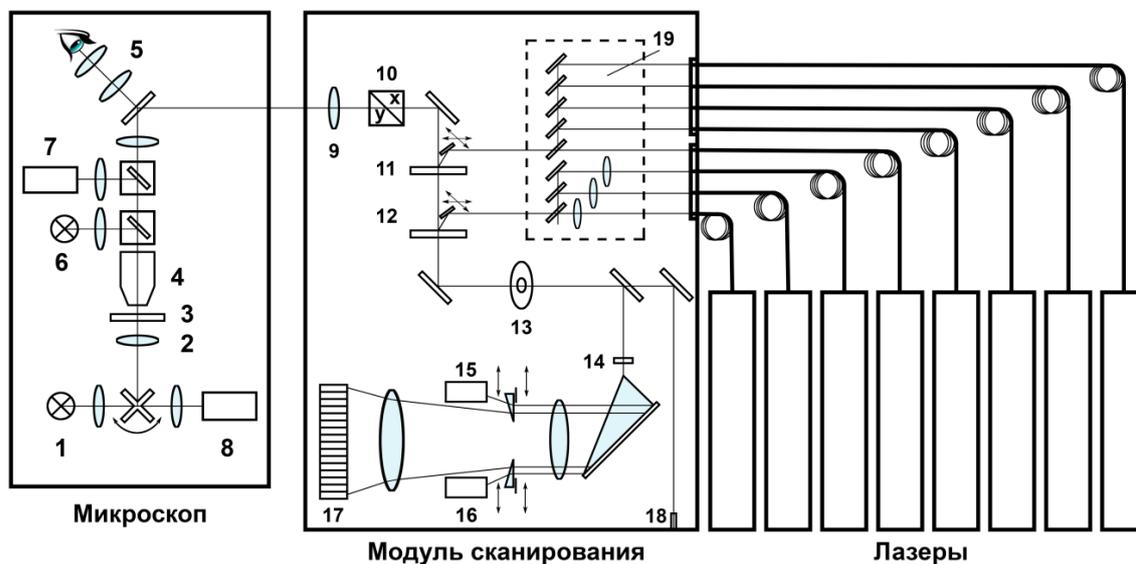


Рис. 12.18. Компонка оптико-механических и приемно-регистрающих устройств конфокального микроскопа [46].

1 – источник света (галогеновая лампа); 2 – конденсор; 3 – объект; 4 – объектив; 5 – окуляр; 6 – ртутная лампа (НВО-100); 7 – цифровая камера; 8 - ФЭУ; 9 – линза; 10 – система сканирования; 11 – турель с запирающими фильтрами; 13 – конфокальная диафрагма; 14 – дифракционная решетка; 15, 16 – ФЭУ; 17 – многоканальный приемник 18 – внешний детектор; 19 – система интерференционных светоделителей.

12.3.2. Полихроматор и приемники излучения

В модуле сканирования размещен полихроматор, предназначенный для регистрации спектра флуоресценции (см. главу 11). Линейное сканирование позволяет регистрировать спектры флуоресценции в каждой точке изображения.

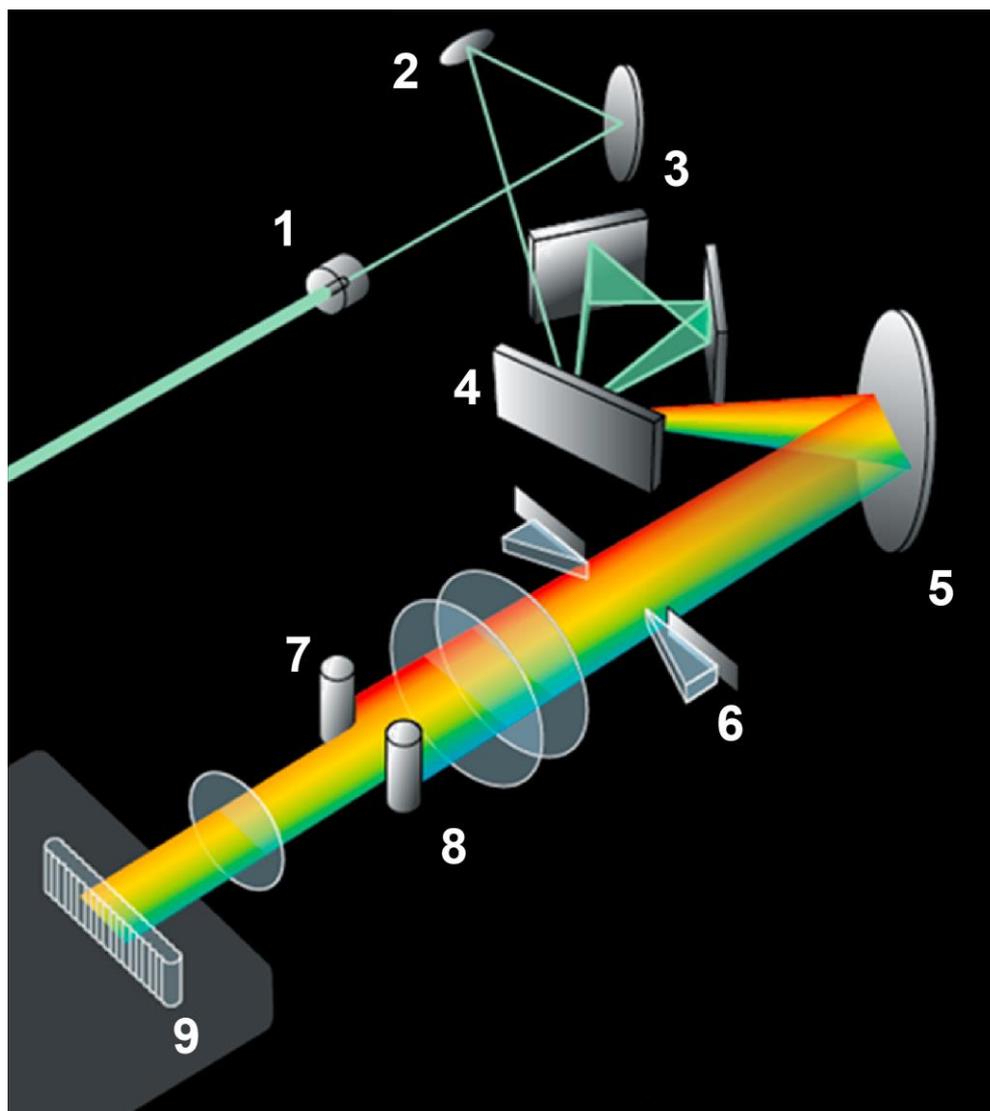


Рис. 12.19. Принципиальная схема полихроматора [49].

1 – конфокальная диафрагма; 2, 3 – зеркала; 4 – дифракционная решетка; 5 – вогнутое зеркало; 6 – выходная щель с отклоняющими призмами; 7 и 8 – фотоэлектронные умножители; 9 – линейка приемников.

В полихроматоре (рис.12.19.) конфокальная диафрагма 1 служит входной «щелью», после которой расходящийся пучок света флуоресценции с апертурой, равной выходной апертуре объектива (как правило, $A_{\text{вых}} \leq 0,04$), преобразуется оптической системой 2 - 3 в параллельный пучок лучей и направляется на неподвижную отражательную дифракционную решетку 4. Вогнутое зеркало 5 создает изображение спектра первого порядка в плоскости многоканального детектора 9, состоящего из 32 приемников (линейки приемников). В результате каждый приемник регистрирует узкий интервал длин волн (10 нм), а на экране монитора отображается спектр, полученный одновременно со всех приемников линейки. Получение такого спектра

особенно важно при регистрации флуоресценции быстро выгорающих объектов.

На рис.12.20. представлен спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, полученный при одновременной регистрации линейкой приемников с разрешением 10 нм (возбуждающая линия лазера 405 нм).

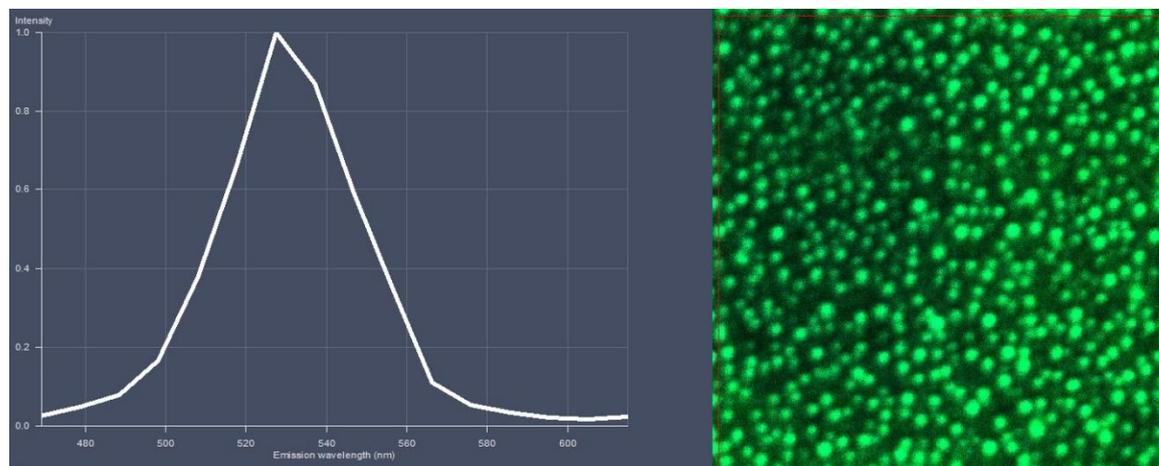


Рис. 12.20. Спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, разрешение 10 нм, $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм, объектив – эпилан-апохромат 50×0,95.

Особенность оптической схемы полихроматора заключается в наличии системы зеркал 2 - 3 (рис. 12.21.а.). Нулевой порядок решетки 1 падает на зеркало 2 и зеркалом 3 возвращается снова на решетку для повторного разложения в спектр, образуя своеобразную петлю. Благодаря многократному повторному разложению нулевого порядка удается повысить эффективность решетки до 97%.

На рис. 12.21.б. представлена приемно-регистрирующая часть полихроматора. При максимальной ширине щели 5 линейка приемников 8 может работать в нескольких режимах:

- На каждый из 32 приемников подается спектральный диапазон длин волн 10 нм (полный диапазон на линейке 320 нм), и регистрируемый спектр флуоресценции выводится на экран монитора, как показано на рис. 12.20.
- Объединяются сигналы с группы соседних приемников, например, 1 - 4; 5-8; 9-12; 13-16 и т.д. Экспериментатор назначает каждой группе определенный цвет, например, последовательность цветов радуги. На экране монитора структуры объекта окрашиваются в различные цвета в соответствии с их спектрами флуоресценции (см. зеленые и красные цвета на рис. 12.23.в. и рис. 12.23.г.).
- Объединяются сигналы со всех приемников линейки в единый сигнал, и на экране монитора получают черно-белое изображение, которому

экспериментатор может назначить любой цвет (псевдоцвет на рис. 12.15.).

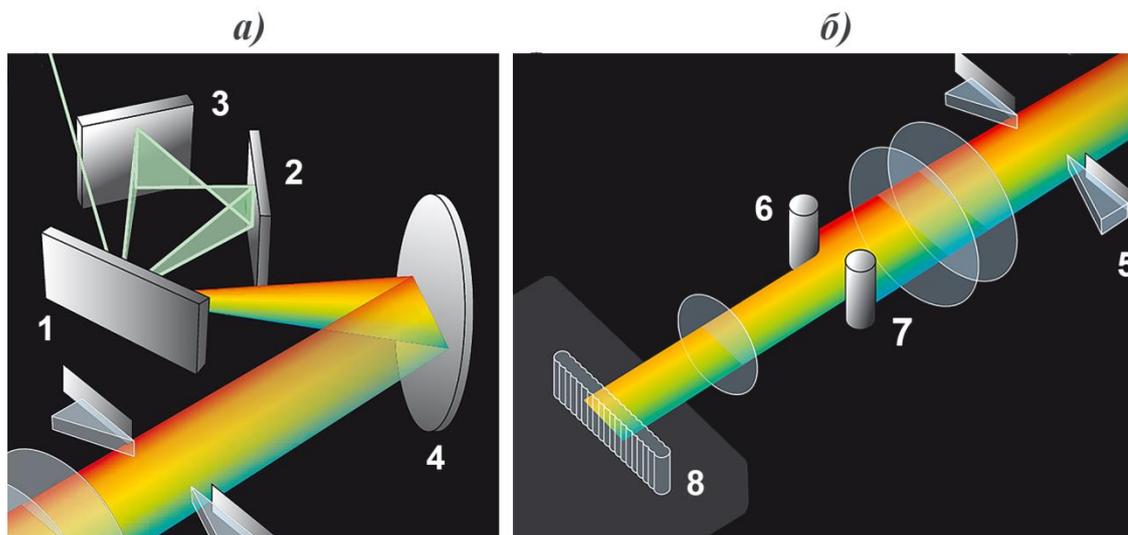


Рис. 12. 21. Зеркальная «петля» полихроматора (а) и приемники излучения (б).

1 - дифракционная решетка; 2 и 3 – плоские зеркала; 4 – вогнутое зеркало; 5 - выходная щель с отклоняющими призмами; 6 и 7 – ФЭУ; 8 - линейка приемников [37].

Для повышения спектрального разрешения полихроматора используют узкую щель 5, которая движется по направляющей вдоль спектра. В этом случае спектр регистрируют не одновременно, а последовательно в зависимости от скорости перемещения узкой щели (дифракционная решетка остается неподвижной). Например, первый приемник линейки последовательно регистрирует три сигнала при трех положениях щели, затем второй приемник регистрирует следующие три сигнала, «вырезанные» движущейся щелью, и т.д. Максимальное спектральное разрешение составляет $3,2 \text{ нм}$, а процесс сканирования щели занимает некоторый интервал времени, например 10 минут.

На рис. 12.22. представлен спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, полученный при последовательной регистрации приемников линейки (сканирование щелью) с разрешением $3,2 \text{ нм}$ (возбуждающая линия лазера 405 нм). Из рисунка видно, что этот спектр имеет более правильную форму по сравнению со спектром, полученным при одновременной регистрации всеми приемниками линейки (см. рис. 12.20.).

Для регистрации слабо флуоресцирующих объектов или быстропротекающих процессов в качестве приемника применяют один из двух фотоэлектронных умножителей. Фотоумножитель 6 имеет высокую чувствительность в красной области спектра, а фотоумножитель 7 - в синей (рис. 12.21.б.). Излучение направляется на ФЭУ с помощью

отклоняющих призм на щели 5, которые вводят в ход лучей. При этом ФЭУ регистрирует излучение определенного спектрального диапазона.

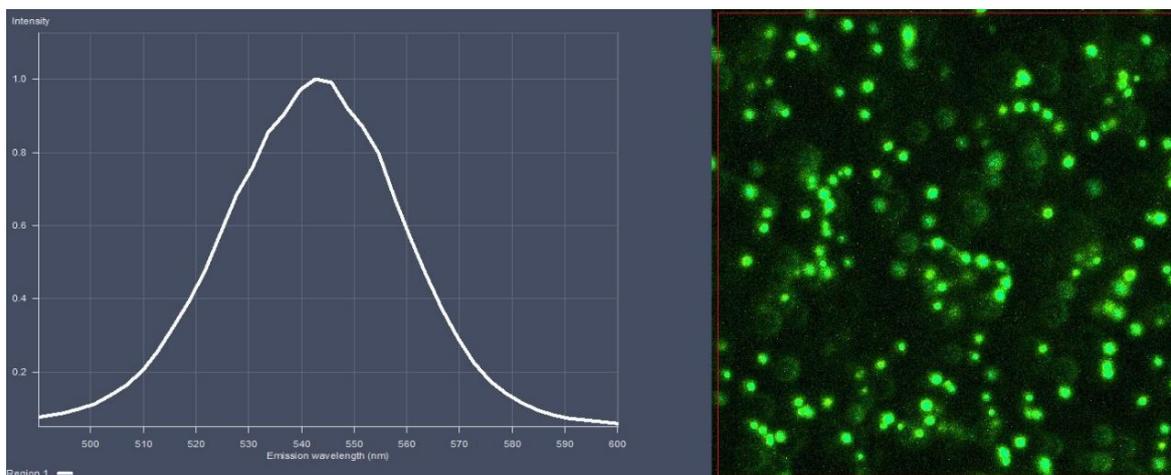


Рис. 12.22. Спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, разрешение 3,2 нм, $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм, объектив – эпиплан-апохромат 50×0,95.

Для сравнения на рис. 12.23. представлены изображения одного и того же места на препарате, полученные с помощью цифровой камеры AxioCam HRc (*a*, *б*) и в конфокальном режиме (*в* и *г*). Препарат представляет собой предметное стекло, на котором размещен толстый срез корневища ландыша, окрашенный двумя флуоресцентными красителями. Объект закрыт покровным стеклом. С объективом Fluor 40×1,4 масляной иммерсии экспериментатор наблюдает через окуляр двухцветное изображение в свете флуоресценции при возбуждении линией $\lambda_{\text{воз}} = 365$ нм (ртутная лампа НВО-100). При наблюдении через окуляр диаметр поля зрения на объекте равен 0,58 мм.

Цифровая камера регистрирует изображение объекта с размером поля 350×260 мкм (рис. 12.23.*a*) и его фрагмент 50×50 мкм (рис. 12.23.*б*), на которых явно виден фон, вызванный рассеянием света в толще объекта. В конфокальном изображении этого объекта и его фрагмента (рис. 12.23.*в,г*) фон отсутствует.

Если перед началом сканирования экспериментатор знает, какими красителями был окрашен объект, то он может назначить псевдоцвета, соответствующие максимумам флуоресценции красителей. В противном случае сначала необходимо получить спектр флуоресценции и по нему назначить псевдоцвета, что и было сделано перед регистрацией двухцветных конфокальных изображений, представленных на рисунках (*в*) и (*г*).

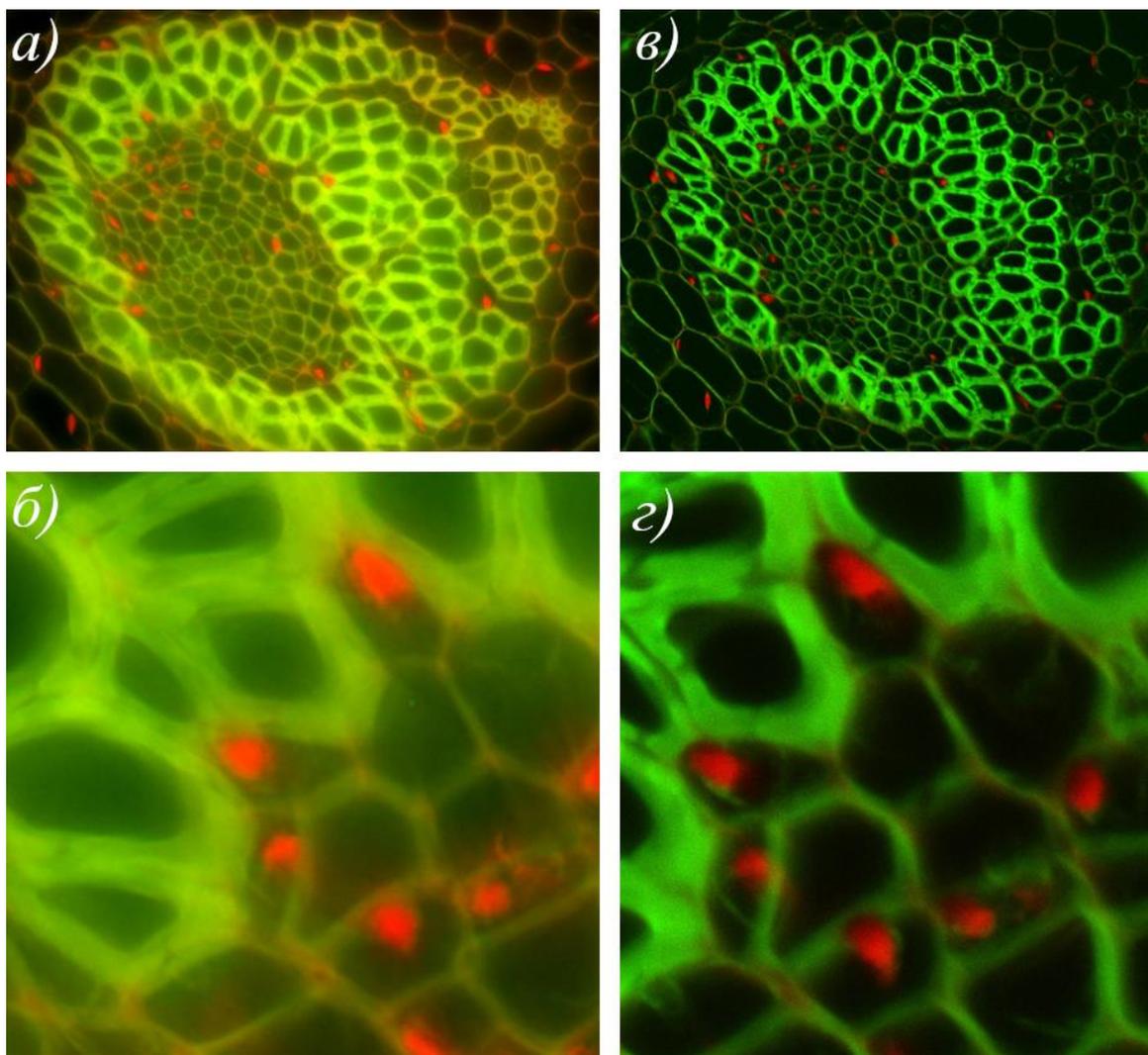


Рис. 12.23. Срез корневища ландыша, окрашенный флуоресцентными красителями при возбуждении ртутной линией $\lambda_{\text{воз}} = 365 \text{ нм}$ (*a*, *б*), и лазером $\lambda_{\text{воз}} = 405 \text{ нм}$ (*в*, *г*), объектив – Fluor 40×1,4 масляной иммерсии.
a и *б* – изображения, полученные с помощью цифровой камеры AxioCam, размер кадра 350×260 и 50×50 мкм, соответственно;
в и *г* – изображения, полученные в конфокальном режиме, размер кадра 350×260 и 50×50 мкм, соответственно, размер конфокальной диафрагмы равен диску Эйри.

Конфокальные изображения получены при возбуждении лазерной линией 405 нм, поэтому сравнения этих изображений с изображениями с цифровой камеры (*a*) и (*б*) могут быть не совсем корректными из-за наличия собственной флуоресценции объекта при его возбуждении ртутной линией 365 нм. Кроме того, вычитание рассеянного света в изображениях цифровой камеры возможно при их обработке с помощью дополнительного программного обеспечения. Таким образом, экспериментатор должен не только четко понимать задачи исследования, но и внимательно относиться к выбору метода, подготовке объекта, способу получения и обработки данных. Например, наличие фона может являться дополнительной информацией.

Заключение

Конфокальная микроскопия постоянно совершенствуется. Фирмы создают новые компоненты, позволяющие эффективно разделять лазерный луч возбуждения и флуоресценцию, совершенствуются приемники излучения и системы сканирования, что позволяет реализовывать новые методы исследования. Основными преимуществами конфокальной микроскопии по сравнению с традиционной являются:

1. высокий контраст изображения;
2. улучшенная разрешающая способность;
3. получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция;
4. мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуоресцентных красителей;
5. локальное измерение спектров люминесценции;
6. возможности применения методов цифровой обработки изображений.

Недостатки конфокальной микроскопии:

1. трудность настройки прибора;
2. отсутствие «оптического» изображения, которое существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора;
3. высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.

Контрольные вопросы

1. Какие требования предъявляются к источнику света для получения спектров комбинационного рассеяния объектов микроскопии?
2. Почему лазеры не применяют в традиционной световой микроскопии?
3. В чем заключается основное отличие формирования изображения в традиционном и конфокальном микроскопах?
4. От каких параметров зависит толщина оптического среза?
5. От чего зависит разрешающая способность конфокального микроскопа?

Глава 13. ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА

Самая большая заслуга Аббе – определение предела разрешения оптических систем, ограниченного волновой природой света. К сожалению, Аббе большую часть своих исследований не публиковал, поэтому его работы по теории микроскопа дошли до нас в основном в изложении его учеников. Так, например, в 1893 году его ученик С. Чапский изложил теорию Аббе в своей работе «Теории оптических инструментов по Аббе» [50]. Только в начале XX века работа Аббе «Теория дифракции в приложении к микроскопу» увидела свет в пятитомном собрании его сочинений [51].

По Аббе предел разрешения традиционного светового микроскопа $d_{\text{пр}} = 0,61 \lambda / n \sin \alpha$ ($A = n \sin \alpha$) при условии $A = (A_{\text{к}} + A_{\text{об}})/2$, что достигается настройкой освещения по Кёлеру ($A_{\text{к}} = A_{\text{об}}$). Таким образом разрешающую способность микроскопа можно повысить за счет трех параметров: апертуры A , показателя преломления n и длины волны λ .

1. *Увеличение числовой апертуры (A)*. Апертурный угол 2α теоретически не может быть больше 180° . Практически, в традиционных «сухих» объективах он меньше из-за наличия рабочего расстояния. Поместить объект на нулевом расстоянии от фронтальной линзы объектива возможно при использовании контактных объективов, впервые разработанных и созданных в ГОИ [52].

2. *Иммерсионные объективы* - следующее средство повышения разрешающей способности. Доступными экспериментаторам являются объективы масляной иммерсии $100\times 1,4$, которые иногда входят в основной комплект исследовательских моделей микроскопов. При этой апертуре предел разрешения составляет $d_{\text{пр}} = 0,61 \lambda / 1,4 \approx 0,44 \lambda$. Реже встречается объектив масляной иммерсии $100\times 1,49$, предназначенный для работы с покровным стеклом $0,17$ мм. Его рабочее расстояние равно $0,08$ мм. Это означает, что расстояние до объекта составляет $0,08 + 0,17 = 0,25$ мм, что значительно превышает длину волны. Предел разрешения такого объектива составляет $d_{\text{пр}} \approx 0,41 \lambda$. Существуют уникальные объективы с еще более высокой апертурой (до 1,7) и специальной иммерсией, тогда их предел $d_{\text{пр}} \approx 0,36 \lambda$. В результате применение иммерсионных объективов позволяет увеличить разрешающую способность в 1,4 раза, а с уникальными объективами, до 1,7 раз по сравнению с «сухими» системами.

3. *Уменьшение длины волны*. Идея применения ультрафиолетовых лучей была впервые реализована в 1904 году в конструкции микроскопа, созданного сотрудниками фирмы «Карл Цейсс» Р. Кёлером и М. Рором. Однако конструкторы столкнулись с большими трудностями,

связанными с поиском оптических материалов, прозрачных в УФ области спектра, и средств регистрации изображения.

Аббе верил, что человеческому разуму удастся преодолеть предел разрешения и, возможно, приборы не будут иметь с традиционными микроскопами ничего общего, кроме названия. Насколько пророческими оказались эти мысли Аббе, мы поймем, обратившись к истории создания электронного [39] и зондового микроскопов.

13.1. Электронная микроскопия

В 1923 году Луи де Бройль предложил гипотезу, согласно которой волновой характер распространения имеет универсальный характер и относится не только к фотонам, но и к массивным частицам, например, электронам.



Луи де Бройль (фр. Louis de Broglie, 1892 - 1987)

Рис. 13.1. Французский физик-теоретик, один из основоположников квантовой механики, лауреат Нобелевской премии по физике (1929) [4].

К началу 30-х годов XX века немецкие ученые М. Кнолль и Э. Руска разработали магнитные линзы, а в 1931 - 1932 годах при помощи магнитных и электростатических линз Кнолль, Руска и почти одновременно с ними Э. Брюхе и Г. Иохансон получили электронно-оптические изображения. Крупным вкладом в развитие электронной оптики были исследования А.А. Лебедева, выполненные во время

пребывания в Англии (1929). Предложенный им способ получения электронограмм в сходящемся электронном пучке получил название «дифракции по Лебедеву».

В короткий промежуток времени электронная микроскопия прошла путь от первых несовершенных микроскопов до приборов, в которых разрешающая способность в 400 раз превышала разрешение световых микроскопов. Одновременно с развитием аппаратуры разрабатывались и новые методы подготовки препаратов, которые составляют существенную часть любого исследования на электронном микроскопе.



Рис. 13.2. Виктор Николаевич Верцнер (1909 – 1980), д.т.н., сотрудник ГОИ, исследовал дифракцию электронов, создавал рентгеновские микроскопы, известен как разработчик первых в России электронных микроскопов.

С 1930-х годов в ГОИ также начались работы по созданию электронного микроскопа под руководством А.А. Лебедева, а с 1935 года к этой работе приступил его сотрудник В.Н. Верцнер (рис. 13.2.), который является непосредственным разработчиком первого отечественного электронного микроскопа. К концу 1940 года в его лаборатории был создан электронный микроскоп с увеличением до 10 000 крат и

разрешением порядка 40 нм. В 1946 году была создана малая серия микроскопов с увеличением 25 000 крат и разрешением 10 нм [51].

13.1.1. Основы электронной микроскопии

Пучок электронов, движущийся в вакууме с постоянной скоростью после ускорения в электрическом поле напряжением V , соответствует волновому процессу с длиной волны λ , которая определяется выражением:

$$\lambda = \frac{1,221}{\sqrt{V}}, [\text{нм}].$$

В случае больших скоростей электронов, при точных расчетах учитывается релятивистская поправка на зависимость массы электрона от скорости, и формула принимает вид:

$$\lambda = \frac{1,221}{\sqrt{V}} \frac{1}{\sqrt{1 + 9,78 \cdot 10^{-7} V}}, [\text{нм}].$$

Для ускоряющего напряжения в 50 000 В, обычного для электронных микроскопов, длина волны λ составляет всего 0,0055 нм, т. е. примерно в 100 000 раз короче длин волн видимого света.

Для получения изображений в электронных лучах применяются электромагнитные линзы, которые преломляют и фокусируют электронные лучи. Скорость электронов и их направление определяются электрическими и магнитными полями, в которых они движутся.

13.1.2. Просвечивающий электронный микроскоп

Электронная микроскопия во многом использует термины и методы световой микроскопии. На рис. 13.3. для сравнения представлены оптическая схема светового микроскопа проходящего света (а) и просвечивающего электронного микроскопа (б). В данной схеме светового микроскопа применяется критическое освещение: конденсор 2 проектирует изображение источника 1 в плоскость объекта 3. Вместо окуляра используется проекционный окуляр 6 (адаптер), который проецирует промежуточное изображение 5 на экран 7.

Оптическая схема электронного микроскопа (б) для исследований в проходящих электронных лучах подобна схеме светового проекционного микроскопа. В электронном микроскопе все оптические элементы светового микроскопа заменяются соответствующими электрическими. Источником электронов служит нагреваемая электрическим током вольфрамовая нить. Электроны ускоряются электрическим полем напряжением от 30 000 до 50 000 В, приложенным между нитью 8 и анодом 9. В центре анода имеется отверстие, сквозь которое пролетают

электроны, используемые для образования изображения. Эта часть микроскопа получила название электронной пушки. Вылетевшие из пушки электроны попадают в поле конденсорной линзы 10, которая фокусирует их на исследуемом объекте 11 [41].

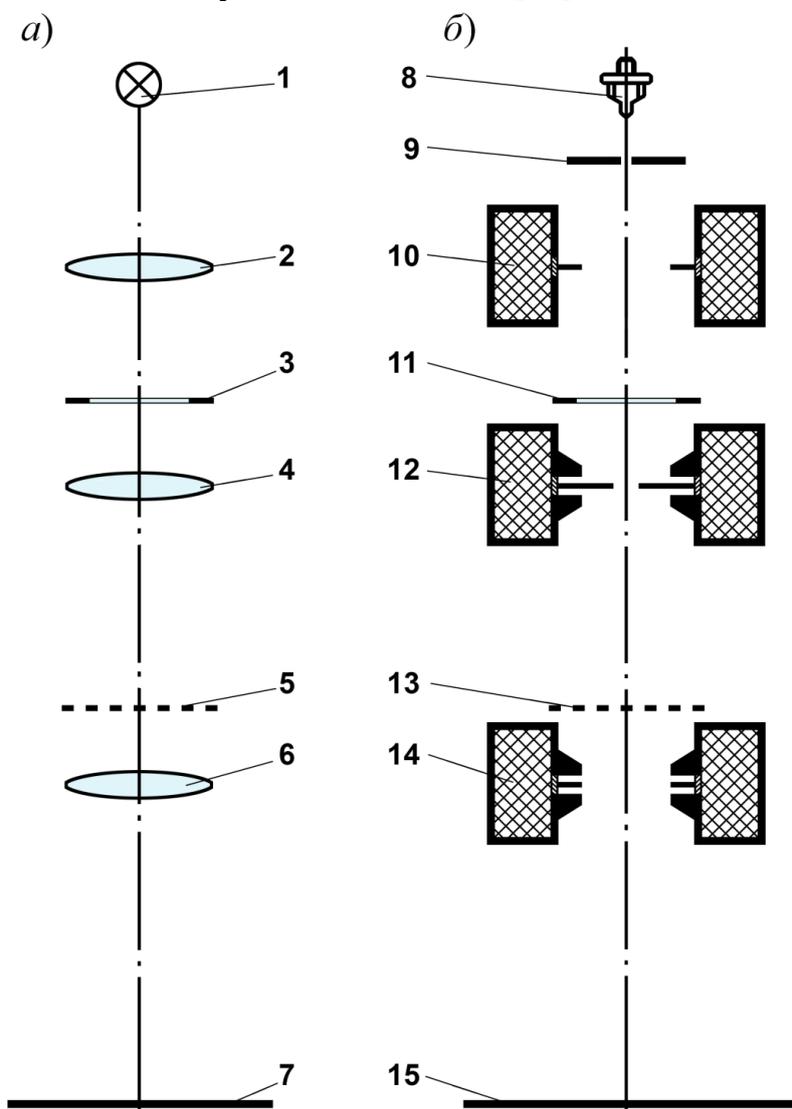


Рис. 13.3. Оптические схемы светового и электронного микроскопов для исследований в проходящих лучах.

а) световой микроскоп проходящего света:

1 – источник света; 2 – конденсор; 3 – объект; 4 – объектив; 5 – плоскость изображения (промежуточное изображение); 6 – проекционный окуляр (адаптер); 7 – экран с изображением;

б) просвечивающий электронный микроскоп:

8 – источник электронов; 9 – анод; 10 – конденсорная линза; 11 – объект; 12 – объективная линза; 13 – плоскость промежуточного изображения; 14 – проекционная линза; 15 – экран с изображением.

В зависимости от толщины и плотности различные структуры объекта по-разному рассеивают падающие на них электроны. На промежуточный экран 13, расположенный после объективной линзы 12,

попадают лишь те электроны, которые при прохождении объекта отклоняются на сравнительно малые углы. Такие участки на экране будут светлыми. Если электроны при прохождении объекта отклоняются на большие углы, то они задерживаются апертурной диафрагмой объектива 12, и соответствующие участки экрана оказываются темными. В центре промежуточного экрана имеется небольшое отверстие, ограничивающее поле зрения. Электроны, прошедшие через это отверстие, снова фокусируются магнитным полем проекционной линзы 14, а на экране 15 формируется окончательное изображение объекта 11.

Изображения электронных микроскопов во многом сходны с изображениями, полученными при рентгеновском структурном анализе. Однако между дифракцией рентгеновских и электронных лучей имеется существенная разница. Первые, обладая высокой проникающей способностью, рассеиваются всем объемом объекта. Вторые, из-за малой проникающей способности, рассеиваются только в тончайших поверхностных пленках толщиной в несколько десятков ангстрем. Это делает метод дифракции электронов особенно ценным для исследования поверхностной структуры [53].

13.1.3. Общие сведения о методах приготовления препаратов

Успех исследований во многом определяется подготовкой препарата. Подготовка препарата зависит от методов исследования, которые разделяются на прямые и косвенные. В случае прямых методов исследуют непосредственно сами объекты, а при косвенных — тончайшие слепки с поверхности объекта.

При прямом исследовании и ускоряющих напряжениях в 50 000 В толщина объекта не должна превышать 0,1 мкм. Объекты наносят на тончайшие пленки-носители толщиной 10 нм, которые играют роль предметных стекол светового микроскопа. Пленки не должны иметь заметной собственной структуры, а также рассеивать и поглощать проходящие через них электронные лучи. На пленки-носители, укрепленные на небольших дисках из частой сетки (100 отверстий на 1 мм²) или на диафрагмах с малыми отверстиями, объекты наносят, например, осаждением из раствора, напылением частиц и т.д. При изучении порошков их частицы наносят иногда на края проволочек, сеток и диафрагм или на тончайшие волокна.

При косвенных методах снимают слепки с поверхности объекта. Слепки подразделяются на негативные и позитивные. При изготовлении негативных слепков на подготовленную поверхность объекта наносят несколько капель специального раствора, а затем отделяют слепок от поверхности. Такие негативные слепки можно приготовить также из кварца и ряда металлов (золота, хрома, алюминия и др.), которые наносят вакуумным испарением. Для получения позитивного или двукратного

слепка сначала делают массивный отпечаток – негатив хорошо воспроизводящий рельеф поверхности, а затем с отпечатка-негатива снимают тончайший слепок-позитив.

Подготовка препаратов требует наличия специального вакуумного оборудования для таких операций, как, например, испарение кварца, алюминия и бериллия и т.д., а для получения срезов – ультрамикротомы. Кроме того, необходимо иметь стереоскопические микроскопы и различные инструменты.

13.1.4. Повышение контрастности изображений

Контраст изображения возникает за счет различного рассеяния электронов структурами объекта. На экран попадают лишь те электроны, которые при прохождении объекта отклоняются на углы, не превышающие апертурного угла объектива (меньше $5 \cdot 10^{-3}$ радиана). В однородных объектах различная рассеивающая способность имеет место в случае изменения толщины отдельных частей препарата. При неоднородных объектах контраст зависит от состава объекта.

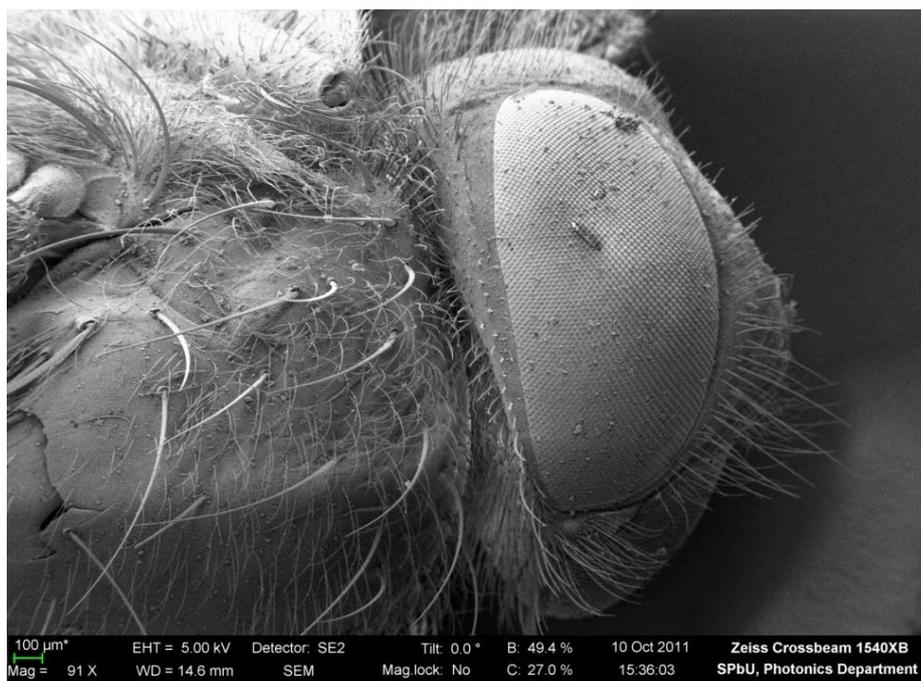


Рис. 13.4. Изображение головки мухи, покрытой слоем алюминия.

Для увеличения контраста на объект (рис. 13.4.) или их слепки наносят в вакууме тонкий слой металла. Испарение металла производят под очень малыми углами. При этом, чем меньше структуры объекта на поверхности препарата, тем меньше должен быть угол, под которым происходит напыление. Количество конденсированного металла зависит от крутизны неровностей. По длине образующихся «теней» судят о

высоте выступов на поверхности. Такие объекты дают изображения с высокой контрастностью, что позволяет значительно повысить разрешение. Для теневых покрытий применяют хром, золото, уран и др.

13.2. Сканирующие зондовые микроскопы

Как в оптических, так и электронных микроскопах предел разрешения ограничивается дифракцией световых или электронных волн. При этом расстояние между объективом и объектом существенно превышает длину волны. В отличие от этих приборов, в зондовых микроскопах разрешение зависит от размера острия зонда, который подводят к поверхности объекта на расстояние порядка длины волны.

Сканирующая зондовая микроскопия предназначена для исследования морфологии и локальных свойств поверхности твердого тела с высоким пространственным разрешением, например, в области тонкопленочных покрытий и технологии создания наноразмерных структур. К семейству зондовых микроскопов относятся:

- сканирующий туннельный микроскоп;
- атомно-силовой микроскоп;
- магнитно-силовой микроскоп;
- электросиловой микроскоп;
- ближнепольный оптический микроскоп.

Первым представителем семейства является сканирующий туннельный микроскоп, изобретенный в 1981 году швейцарскими учеными Гердом Биннигом и Генрихом Рорером и принесший его создателям Нобелевскую премию (1986).

13.2.1. Принцип работы

В сканирующих зондовых микроскопах исследования проводятся с помощью специальным образом изготовленных зондов в виде игл, размеры рабочей части (острия) которых составляют около десяти нанометров. Зонд подводят к поверхности объекта на расстояние 0,1 – 10 нм. Между зондом и поверхностью возникают различного типа взаимодействия, например появление туннельного тока между металлической иглой и проводящим образцом.

Если измеряемый параметр P , возникающий между зондом и поверхностью, зависит от расстояния зонд-образец $P = P(z)$, то его используют для организации системы обратной связи, т.е. для контроля расстояния между зондом и образцом. На рис. 13.5. представлена схема, поясняющая принцип организации обратной связи сканирующего зондового микроскопа.

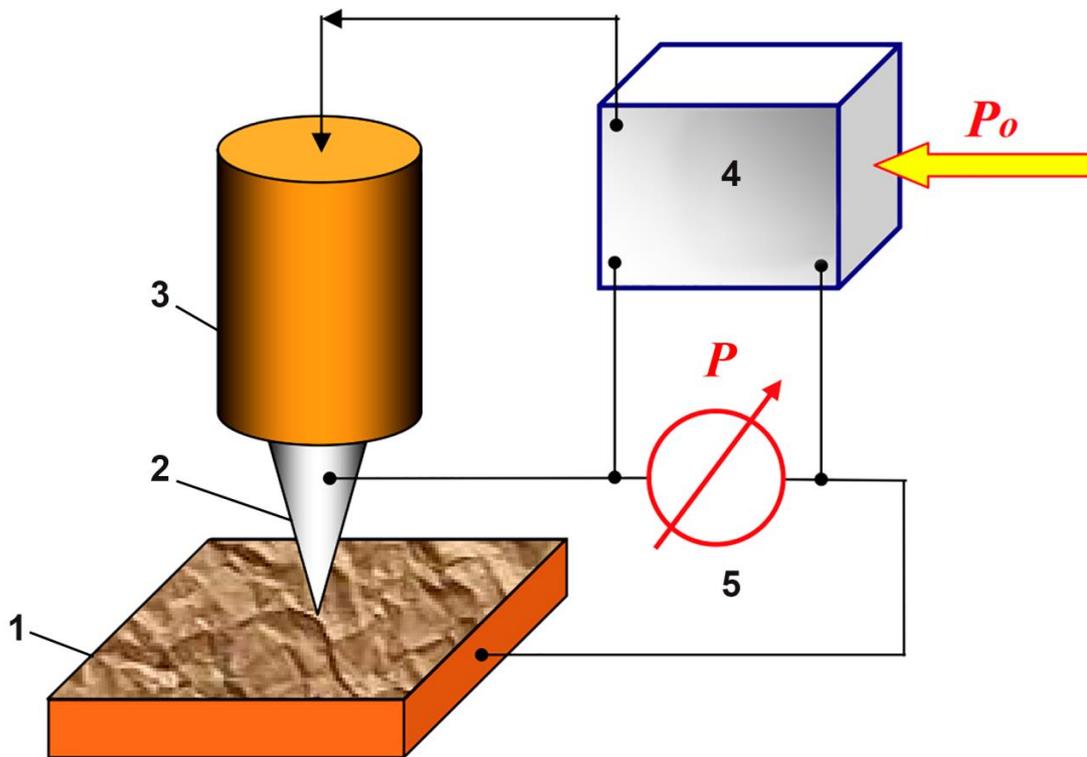


Рис. 13.5. Схема системы обратной связи зондового микроскопа [54].

1 – образец; 2 – зонд; 3 – исполнительный элемент; 4 – блок обратной связи; 5 – измерительный прибор.

Система обратной связи поддерживает значение параметра P постоянным, равным величине P_0 (заданный оператором). Если расстояние зонд-поверхность изменяется, то изменяется и величина параметра P . В системе обратной связи 4 формируется разностный сигнал, пропорциональный величине $\Delta P = P - P_0$, который усиливается до нужной величины и подается на исполнительный элемент 5. Исполнительный элемент обрабатывает данный разностный сигнал, приближая зонд 2 к поверхности образца 1 или отдаляя его до тех пор, пока разностный сигнал не станет равным нулю. Это позволяет поддерживать расстояние зонд-образец. В существующих зондовых микроскопах точность удержания расстояния зонд-поверхность достигает величины $\sim 0,01$ нм.

При перемещении зонда вдоль объекта происходит изменение параметра взаимодействия P , обусловленное рельефом поверхности. Система обратной связи 4 отслеживает эти изменения, так что при перемещении зонда в плоскости XU сигнал на исполнительном элементе 3 соответствует рельефу поверхности.

Для получения изображения осуществляют сканирование, при котором зонд вначале движется над объектом вдоль определенной линии (строчная развертка). При этом величина сигнала на исполнительном

элементе записывается в память компьютера. Затем зонд возвращается в исходную точку и переходит на следующую строку сканирования (кадровая развертка), и процесс повторяется вновь. Изображение рельефа поверхности воспроизводится с помощью средств компьютерной графики [54,55].

Зондовые микроскопы нуждаются в защите от внешних воздействий: механических вибраций, акустических шумов, температурных изменений и т.д. Поэтому неудивительно, что создатели таких приборов иногда стремятся совместить в одном устройстве высокое пространственное разрешение зондового микроскопа с конструкцией и методами традиционного оптического микроскопа.

Заключение

Правильная настройка микроскопа и подготовка препарата - условия получения надежных результатов. Поэтому, приступая к работе, необходимо быть уверенным в том, что схема прибора хорошо отцентрирована и сфокусирована, что приняты все меры для устранения посторонней засветки (например, рассеянного света) и что измерительная система работает нормально.

В заводских условиях настройка оптической схемы прибора производится мастерами высокой квалификации, использующих специальные методы контроля и юстировочные приспособления, а к потребителю прибор поступает, как правило, в законченном виде. Однако в силу специфики оптической и механической схемы микроскопа на долю экспериментатора остается достаточно большое число «степеней свободы», которыми он должен умело распорядиться сам. Кроме этого, экспериментатор должен самостоятельно оценить уровень рассеянного света в монохроматоре и микроскопе, электрическую и механическую нестабильность схемы, поскольку все эти характеристики зависят от конкретных условий эксплуатации прибора и могут изменяться во времени.

В заключение следует отметить, что ценность информации, полученной с помощью микроскопии, возрастает при ее сочетании с другими взаимодополняющими друг друга методами исследования.

Контрольные вопросы

1. На каком физическом явлении основан электронный микроскоп и каков предел его разрешения?
2. В чем отличия подготовки препарата к исследованию для светового и электронного микроскопов?
3. В чем заключается принципиальное отличие сканирующего зондового микроскопа от конфокального микроскопа?

ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ДИФРАКЦИИ

Историческое введение

Волновая теория в том виде, в котором она теперь существует, является результатом длительной эволюции взглядов. В 1657 году Пьер Ферма выдвинул свой знаменитый «принцип наименьшего времени» в следующей форме: «Природа всегда следует наикратчайшему пути». Принцип Ферма имеет огромное философское значение и в свое время породил множество споров, так как его истолкование не свободно от теологических положений [56].



Рис. 1. Французский математик Пьер Ферма (Pierre de Fermat), 1601 – 1665 [3].

Впервые явление интерференции, а именно возникновение разноцветной окраски тонких пленок (в настоящее время такая картина называется «кольцами Ньютона»), было независимо обнаружено Робертом Бойлем и Робертом Гуком. Гук установил также наличие света в области геометрической тени, т.е. «дифракцию» света. Он впервые высказал мысль, что свет «состоит» из быстрых колебаний, распространяющихся мгновенно или с очень большой скоростью на любые расстояния, а каждое колебание в однородной среде порождает сферу, радиус которой постепенно растет со временем.



Роберт Гук
(Robert Hooke),
1635 – 1703



Христиан Гюйгенс
(Christiaan Huygens),
1629 – 1695



Исаак Ньютон
(Isaac Newton),
1642 – 1727

Рис. 2. Ученые, члены Лондонского Королевского общества, основоположники волновой и корпускулярной теорий света [3].

Волновая природа света была существенно расширена Христианом Гюйгенсом. Он выдвинул принцип, названный позднее его именем. Согласно этому принципу, каждую точку «эфира», до которой дошло световое возмущение, можно рассматривать как центр нового возмущения, распространяющегося в виде сферической волны. Эти вторичные волны комбинируются таким образом, что их огибающая определяет волновой фронт в любой последующий момент времени. С помощью этого принципа Гюйгенсу удалось вывести законы преломления и отражения света.



Томас Юнг (Thomas Young),
1773 – 1829



Август Френель (August Fresnel)
1788 – 1827

Рис. 3. Пионеры теорий дифракции света [3].

Ньютон придерживался иных взглядов на природу света. Он создал корпускулярную теорию, согласно которой свет распространяется от излучающего тела в виде мельчайших частиц. Остриение волновой теории таким авторитетом, как Ньютон, привело к полному забвению волновой теории почти на столетие [56].

Открытия в физике начала XIX века привели к полному признанию волновой теории. Первым шагом послужило объяснение интерференции и цветов тонких пленок, предложенное Томасом Юнгом в 1801 году. Однако из-за того, что идеи Юнга носили, в основном, качественный характер, они не получили широкого признания [56].

К основным представлениям о явлениях дифракции относятся трактовки Юнга (1800) и Френеля (1815) [56]. Согласно Юнгу, возникновение дифрагированной волны имеет локальный характер. Например, он считал, что при освещении отверстия волной дифрагированные волны формируются *только на границе отверстия*.

Френель отказался от локальной трактовки дифракции. Используя принцип Гюйгенса, он представил дифракционные явления как результат интерференции полей бесконечного множества фиктивных элементарных источников, распределенных *по всей площади отверстия* и имеющих амплитуду и фазу, пропорциональные таковым у волны, падающей на отверстие. Сочетание построения Гюйгенса с принципом интерференции впоследствии было названо принципом Гюйгенса-Френеля.

Теория Френеля математически была разработана лучше, чем у Юнга, и поэтому стала преобладающей. Однако локальный подход Юнга является более адекватным физической сути явления дифракции, а Френеля - более формальным. В дальнейшем было показано, что результаты вычислений по методу Френеля после математического преобразования приводят к форме, высказанной Юнгом [56].

Геометрическая теория дифракции

В 1953 году Дж. Келлер разработал основы теории, которую можно считать развитием трактовки Юнга. Келлер обобщил понятие луча, включив в рассмотрение не только лучи *геометрической* оптики, но и лучи, дифрагированные на *границе* препятствия, применив к ним обобщенный принцип Ферма. Келлер назвал ее *геометрической теорией дифракции*, подчеркивая этим самым геометрическую основу такого подхода. Эта теория, изложенная в [57 – 60], нашла широкое применение в области радиолокации и используется при исследовании отражательной способности различных объектов. Кратко изложим основные ее положения.

Лучевая структура поля. В геометрической теории дифракции вводится понятие дифрагированных лучей, которые образуются при

встрече падающих лучей с кромками, углами, отверстиями, вершинами граничных поверхностей и при касании лучами таких поверхностей. Рассмотрим поле в точке P от источника света O с учетом отражения от поверхности и дифракции на крае (рис. 4).

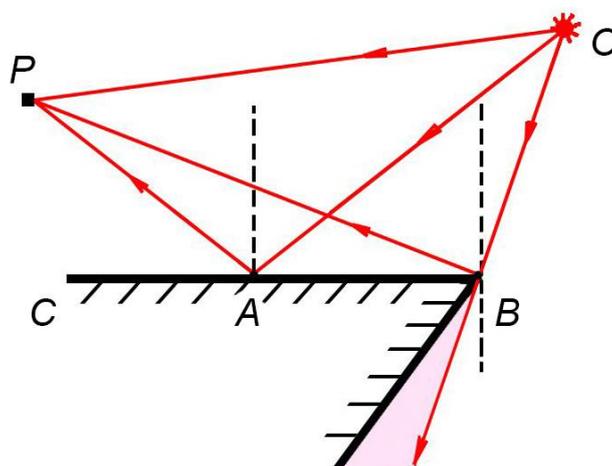


Рис. 4. Формирование поля в точке P с учетом отражения и дифракции. OP - геометрический луч; AP - геометрический луч, отраженный от поверхности BC ; BP - луч, дифрагированный на краю в точке B .

Пусть в точке O расположен точечный источник света. В *геометрической оптике* в точку P попадает прямой луч OP и луч OAP , отраженный от поверхности BC . Согласно принципу Ферма, расстояние OAP вдоль пути луча является минимальным по закону отражения. Луч OB , падающий на край, претерпевает дифракцию. Келлер ввел класс лучей, которые включают в свою траекторию точку B . Согласно принципу Ферма, расстояние OBP вдоль пути луча должно быть минимальным, откуда следует закон дифракции на крае. Итак, в точку P от источника O попадают три типа лучей: прямые (OP), отраженные (OAP) и дифрагированные на крае (BP).

Для дифрагированных лучей точка B является начальной точкой. Если предположить, что поток энергии в лучевой трубке дифрагированных лучей остается постоянным, а фаза вдоль луча изменяется относительно этой начальной точки, то выражение для дифрагированного поля будет иметь тот же вид, что и для классического геометрического поля. После своего возникновения дифрагированные лучи ведут себя точно также, как и обычные геометрические лучи. Отличие заключается в законах, которым подчиняется *образование* дифракционных лучей.

В теории *постулируется*, что дифракционные лучи порождаются не всеми геометрическими лучами поля, а только некоторыми: 1) лучами, попавшими на неоднородности тела (вершины, линии разрыва кривизны

поверхности, ребра и т.п); 2) лучами, касающимися тела. Другими словами, дифракционные лучи как бы возникают из падающих на тело «крайних лучей» геометрической оптики, т.е. лучей, разграничивающих свет и тень. Каждый такой геометрический луч порождает целый веер дифрагированных лучей. В общем случае их амплитуда пропорциональна амплитуде падающего луча и коэффициенту дифракции, зависящему от направления падающего и дифрагированного лучей. Коэффициент дифракции вычисляют при решении соответствующей модельной задачи. В работах Келлера приведены формулы вычисления коэффициентов дифракции для некоторых случаев: дифракции на клине, крае, отверстии и т.д. Эти коэффициенты получают из асимптотических разложений точных решений канонических задач и могут быть использованы при расчете рассеяния от более сложных тел.

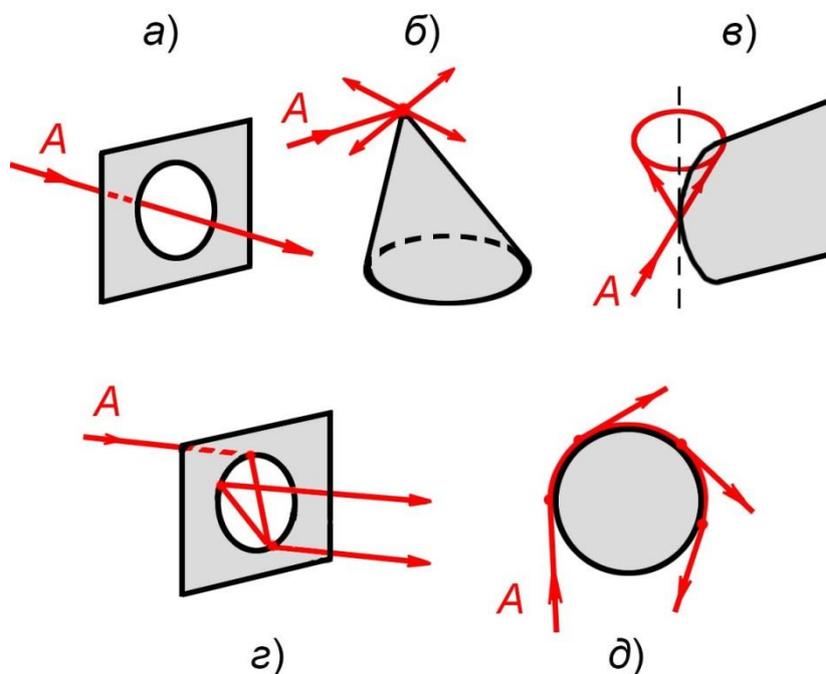


Рис. 5. Дифракция геометрического луча A на различных моделях препятствий.

а) геометрический луч прошел через отверстие без дифракции; б) дифракция геометрического луча на вершине; в) дифракция на крае; г) многократная дифракция в отверстии; д) поверхностные лучи на гладком цилиндре.

На рис. 5 изображены различные случаи дифракции геометрического луча A на препятствиях, рассматриваемые в геометрической теории дифракции как модельные случаи. Такой подход позволяет представить сложные поля в виде суперпозиции более простых полей.

Каустики и волновые фронты. В геометрической теории дифракции, как и в геометрической оптике, используются такие понятия, как каустики и волновые фронты. Каустика - это место локального

максимума амплитуды поля. Необходимо учитывать *правило сдвига фазы*, а именно: при каждом касании каустики луч приобретает фазовый сдвиг $e^{-iq\pi/2}$, где q - число центров кривизны, заключенных между двумя точками луча, касающегося каустики (до и после касания). В частности, когда каустика в трехмерной задаче вырождается в точку (фокус сферического фронта волны), то получается известный фазовый сдвиг $e^{-i\pi}$. Это означает, что при переходе через фокус фаза претерпевает скачок, равный π [1].

Дифракция на отверстиях. Дифракцию на отверстиях произвольной формы можно рассматривать как дифракцию на краю отверстия. При этом дифрагированное поле в точке P (рис. 6) будет определяться вкладом дифрагированных лучей, выходящих из различных точек границы отверстия и проходящих через точку P .

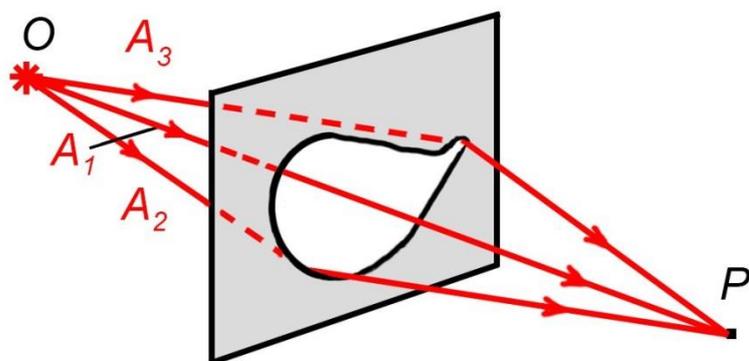


Рис. 6. Схематическое представление прохождения лучей от источника света O в точку P через отверстие произвольной формы в непрозрачном экране.

Лучи, дифрагированные на «плавном» краю отверстия и на его изломе, отличаются коэффициентами дифракции, а, следовательно, и амплитудой. Таким образом, результирующее поле в точке P зависит от формы отверстия.

На рис. 7 изображены два случая дифракции плоской волны AA на круглом отверстии в непрозрачном экране: *а)* размер отверстия значительно превышает длину волны; *б)* размер отверстия сопоставим с длиной волны. За экраном BB краевые геометрические лучи A_1 и A_3 порождают веер дифрагированных лучей. Эти лучи интерферируют с прошедшими без дифракции геометрическим лучом A_2 , а все вместе составляют лучевую структуру поля. Кромка отверстия является каустикой дифрагированных лучей и представляет собой как бы кольцевой источник света, распределение интенсивности которого зависит от направления распространения геометрических лучей. Дифрагированные лучи ведут себя как сферическая волна, а

геометрические лучи - как плоская. По правилу сдвига фаз разность фаз между этими лучами составляет $\pi/2$.

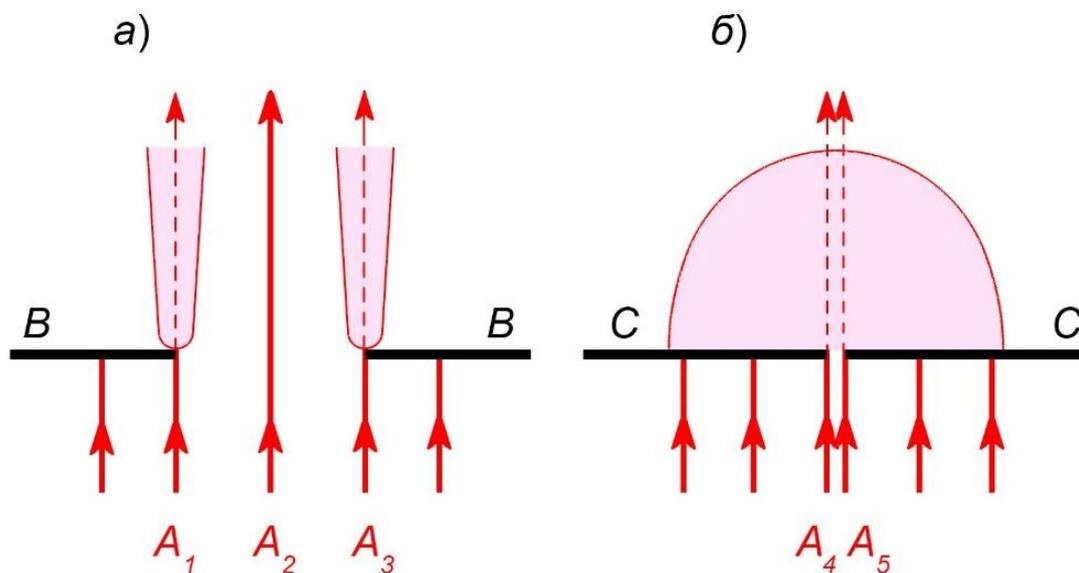


Рис. 7. Дифракция лучей на круглом отверстии в непрозрачном экране.

BB и CC – непрозрачные экраны; A_1 , A_3 , A_4 , A_5 – «крайние» геометрические лучи; A_2 – геометрический луч, прошедших через отверстие;

а) размер отверстия значительно превышает длину волны;

б) размер отверстия сопоставим с длиной волны.

В случае, когда на отверстие, размер которого значительно превышает длину волны, падает плоский фронт геометрических лучей, поле за отверстием является суперпозицией параллельного пучка прошедших геометрических лучей (луч A_2) и расходящегося пучка дифрагированных лучей.

Особый интерес представляет случай, когда диаметр отверстия сопоставим с длиной волны, а поле за экраном CC рассматривается на расстоянии, во много раз превышающем длину волны. Фронт дифрагированных лучей разворачивается практически в полусферу, причем, чем меньше отверстие, тем с большим основанием фронт можно считать сферическим (рис. 7.б.). По правилу сдвига фаз между дифрагированными и геометрическими лучами разность фаз составляет $\pi/2$.

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА

Идея создания конфокального сканирующего микроскопа принадлежит американскому ученому Марвину Ли Минскому. Выпускник Гарвардского университета Минский защитил две диссертации - в Гарварде (1950) и Принстоне (1954). В 1958 году он приступил к работе в Массачусетском технологическом институте, в котором стал одним из основателей лаборатории информатики и искусственного интеллекта.

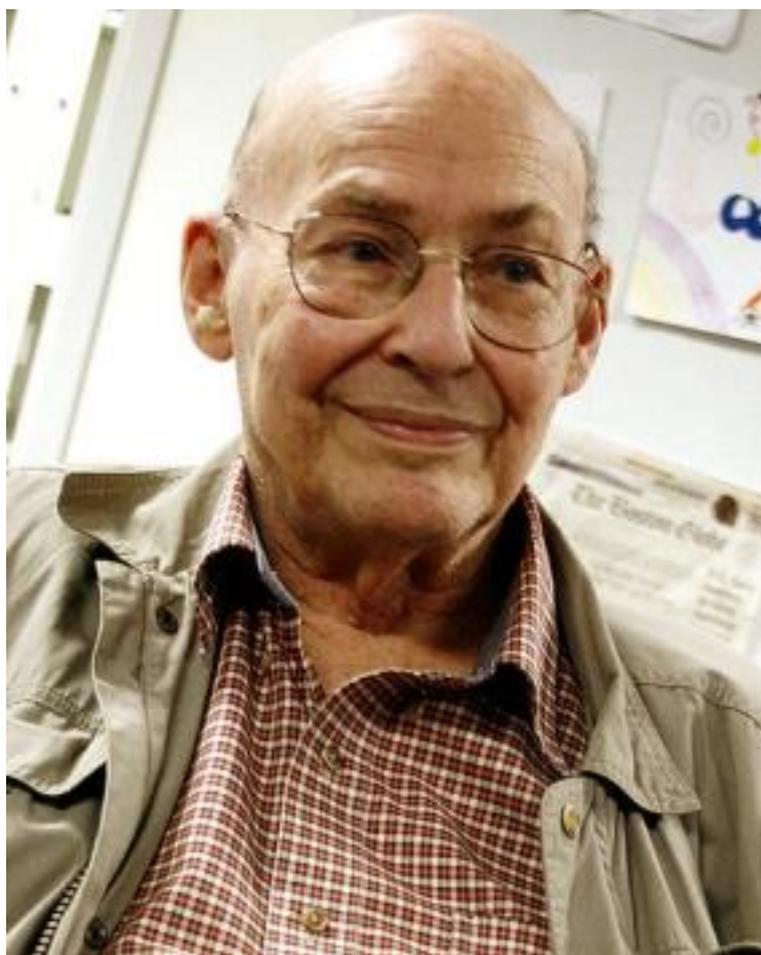


Рис. 1. Марвин Ли Минский (Marvin Lee Minsky) 1927 – 2016 [61].

Минский занимался задачей визуализации нейронных связей в неокрашенных препаратах ткани мозга. Он предложил использовать конфокальную схему для флуоресцентных микроскопов, а в 1957 году получил на эту схему патент. Естественным желанием ученого была визуализация биологических процессов в живых системах. Однако изобретение Минского осталось незамеченным, скорее всего, из-за отсутствия интенсивных источников света и возможностей

компьютерной техники, необходимой для обработки больших объемов информации [61].

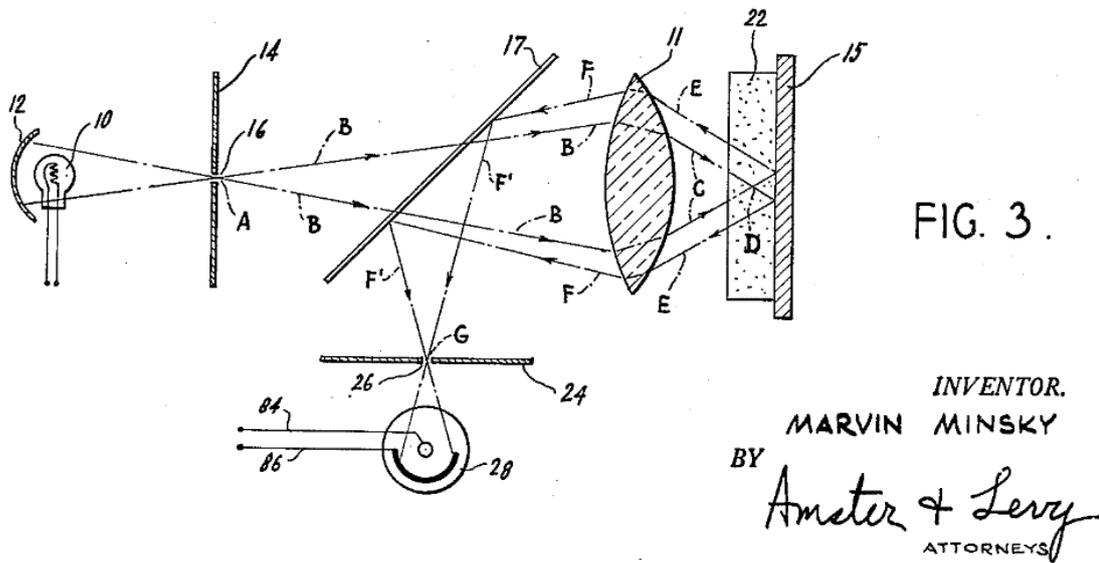


Рис. 2. Схема конфокального микроскопа из патента Марвина Минского [4].

В 1969-1971 годах Дэвид Эггер и Пол Давидович из Йельского университета опубликовали описание первого конфокального лазерного сканирующего микроскопа для наблюдения нервной ткани. Объектив фокусировал на объект одну точку лазерного излучения. В качестве источника использовался 5 мВт гелий-неоновый лазер (633 нм). Сканирование осуществлялось за счет перемещения объектива. Объектив фокусировал отраженный от объекта свет на диафрагму перед фотоумножителем. Сигнал визуализировался с помощью осциллографа, катодный луч которого перемещался одновременно с объективом [4].

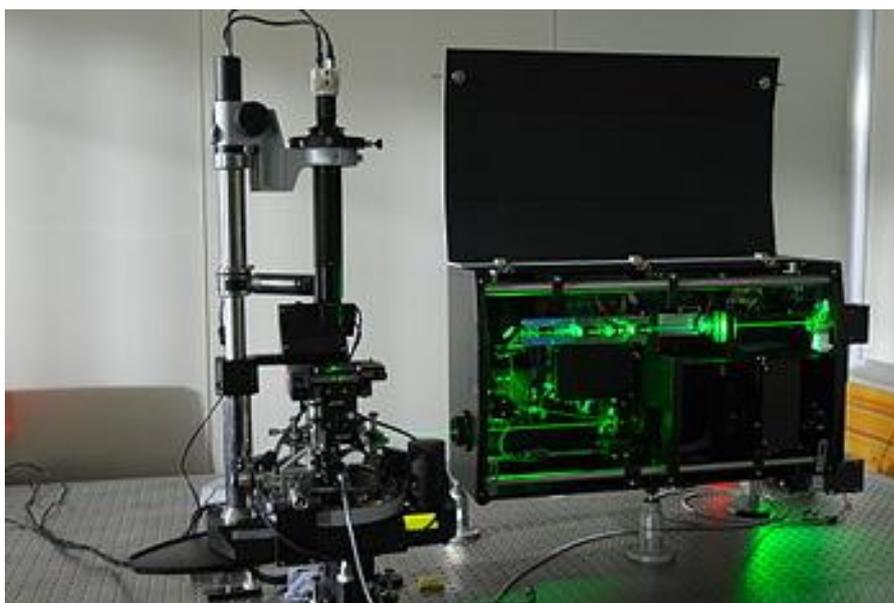


Рис. 3. Лабораторный макет конфокального лазерного сканирующего микроскопа [4].

В дальнейшем основное внимание исследователей было направлено на анализ применения флуоресцентных красителей для исследований живых клеток (*in vivo*) и улучшение качества конфокального изображения за счет увеличения интенсивности возбуждающего излучения.

В 1977 году Колин Дж. Р. Шеппард и Амаржиоти Чоудхури опубликовали теоретический анализ конфокальных и лазерно-сканирующих микроскопов. Вероятно, эта работа была первой научной публикацией, в которой использовался термин «конфокальный микроскоп». В 1979 году Фред Бракенхофф и его коллеги продемонстрировали на практике возможности получения оптических срезов и улучшение разрешения. В 1983 году И. Кокс и Ш. Шеппард опубликовали работу, в которой управление конфокальным микроскопом осуществлялось с помощью персонального компьютера [3, 4].

В середине 1980-х годов Уильям Брэдшоу Амос и Джон Грэлхем Уайт с коллегами из Лаборатории молекулярной биологии в Кембридже создали конфокальный лазерно-сканирующий микроскоп, сканирование в котором осуществлялось последовательным перемещением луча по объекту. Данная схема позволила значительно увеличить скорость сканирования за счет отказа от инерционных механических систем сканирования.

Совет медицинских исследований (MRC) Великобритании спонсировал разработку прототипа современного промышленного конфокального микроскопа, который в дальнейшем был приобретен компанией Bio-Rad. Прибор был оснащен компьютерным управлением и назван «MRC 500». Следующая модель MRC 600 стала основой первого двухфотонного флуоресцентного микроскопа, разработанного в 1990 году в Корнельском университете.

В Германии компания Heidelberg Instruments, основанная в 1984 году, разработала технологию КЛСМ, которая первоначально предназначалась для промышленного применения, а не для биологии. Первые промышленные приборы появились в 1987 году, а в начале 1990-х годов данная технология начала активно развиваться в компаниях Leica Lasertechnik и Carl Zeiss.

Итак, в 1990-х годах достижения в области оптики и электроники позволили получить стабильные и мощные лазеры, эффективные зеркальные сканирующие системы, волоконную оптику, улучшенные диэлектрические покрытия и чувствительные приемники с низким уровнем шума. Кроме того, появились новые флуоресцентные красители, спектры возбуждения которых соответствовали лазерным линиям. В сочетании с быстро растущей скоростью компьютерной обработки, улучшенными дисплеями и технологией хранения больших объемов информации была подготовлена техническая база для лазерной

сканирующей конфокальной микроскопии. Эти микроскопы в настоящее время используются для рутинных исследований молекул, клеток и живых тканей, которые были невозможными 20-30 лет назад. На рис. 4 представлен лазерный конфокальный микроскоп, созданный на базе традиционного инвертированного микроскопа.



Рис. 4. Лазерный конфокальный микроскоп LSM 980, на базе инвертированного микроскопа Axio Observer Z1, Carl Zeiss [48].

Конфокальный микроскоп LSM 980 предназначен для исследования фиксированных и живых биологических объектов. Системы сканирования и регистрации позволяют получать изображения сложных образцов с высокой частотой кадров при малых мощностях облучения светочувствительных объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Г.Н., Захаров В.В. Основы микроскопии. Часть 1. Учебное пособие. СПб: Университет ИТМО, 2018. 133 с.
2. Иоффе Г.А. Фазовоконтрастная и интерференционная микроскопия // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. 163 с.
3. Molecular Expressions [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://micro.magnet.fsu.edu/index.html>.
4. Википедия – свободная энциклопедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://wikipedia.org>
5. Микроскопическая техника [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://labx.narod.ru/documents/keller.html>
6. Родионов С.А. Основы оптики. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://aco.ifmo.ru/el_books/basics_optics/help.html
7. Агроскин Л.С., Папаян Г.В. Цитофотометрия. Л.: ТТЛ., 1977. 295 с.
8. Колтовой Н.А. Книга 8. Методы контрастирования в микроскопии. V.5, Москва: 2016. 116 с. // Режим доступа: <https://docplayer.ru/35792589-Kniga-8-metody-kontrastirovaniya-v-mikroskopii.html>, свободный
9. Лаборатория «Микрокосмос» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://microcosmos555.blogspot.com>
10. Четыре глаза [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.4glaza.ru/articles/mikroskopiya-metod-temnogo-polya>
11. Phisical Bog [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.bog5.in.ua/index.php>
12. Естественно-научный образовательный портал [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://en.edu.ru>
13. Scorica [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://scorica.ru>
14. Захарьевский А.Н. и Кузнецова А.Ф. Методы исследований. Интерференционные биологические микроскопы // Цитология. Л.: АН СССР, 1961, т. III. №2. С. 213 – 224.
15. Лебедев А.А. Поляризационный интерферометр и его применения // Труды Гос. оптического инст., 1931, 5, 53: С. 1 – 32.
16. Smith F. H. 1947. British patent specification. 639014.
17. Smith F. H. 1955. Microscopic interferometry. Research, 8, 9: 385—395.
18. Физический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия. 1960.
19. Шерклифф У. Поляризованный свет. М: МИР, 1965, 264 с.
20. Nomarski G. 1955. Microinterferometre differentiel a ondes polarisees. J. phys. radium 16, 3:9-13.

21. Захарьевский А.Н. и Федин Л.А. Измерение двойного лучепреломления волокон // Оптика и спектроскопия. М.: АН СССР. 1959, т. VI. С. 701-703.
22. Забродина Г.Н. Цветкова Л.Н., Хоменкова С.А. Устройство для реализации метода дифференциально-интерференционного контраста по Номарскому в микроскопах проходящего света // Оптико-механическая промышленность, 1991, № 8, С.65 – 68.
23. Шубников А.В. Основы оптической кристаллографии. М.: АН СССР, 1958. 205 с.
24. Лаборатория метеоритики ГЕОХИ РАН [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.meteorites.ru/menu/moon>
25. Захарьевский А.Н. Интерферометры. М.: Оборонгиз, 1952. 296 с.
26. Коломийцов Ю.В. Интерферометры. Л.: Машиностроение, 1976. 295 с.
27. Оптический производственный контроль / Под ред. Д. Малакары; Пер. с англ. Е.В. Мазуровой и др. Под ред. А.Н. Соснова. М.: Машиностроение, 1985. 400 с.
28. Техноком, научно-производственное объединение [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.tehno.com/product.phtml?uid=B00120038073>
29. Инструкция к прибору. Интерференционно-поляризационный микроскоп MPI 5. WHZ – ZR-036521/68 – Printed in Poland.
30. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969. 511 с.
31. Описание микроскопа [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.mikroskop-online.de/Mikroskop%20BDA/30-310-1%20%20PERAVAL%20interphako.pdf>
32. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: МИР, 1972. – 510 с.
33. Лансберг Г.С. Оптика. Учебное пособие. Для вузов. – 6-е изд., стереот. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – 848 с.
34. Лёвшин Л. В., Салецкий А. М. Люминесценция и ее измерения: Молекулярная люминесценция. — М.: Изд-во МГУ, 1989, — 272 с. — ISBN 5—211 — 00373—X.
35. Мейсель М.Н. Опыт работы с люминесцентными микроскопами. // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. – С. 97 – 104.
36. Сенченкова Е.М. Цвет – создатель хроматографии. М.: Янус-К, 1997. – 440 с.
37. Брумберг Е.М., Крылова Т.Н. Применение интерференционных делительных зеркал в флуоресцентной микроскопии // Журн. Общей биол. 1953. Т. 14. N. 16. С. 461-464.
38. Иоффе Г.А., Федин Л.А. Световая микроскопия. Сб. 50 лет ГОИ им. С.И. Вавилова. // Л.: Машиностроение, 1968. - С. 223-233.

39. Совлаб [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.sovlab.ru/kyuvetyi-dlya-fotokolorimetrov-i-spektrofotometrov.html>
40. Азимут Фотоникс [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://azimp-micro.ru>
41. Октанта [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://oktanta.ru/naznachenie_svetofiltrov_v_mikroskopah_statja
42. Пейсахсон И.В. Оптика спектральных приборов. Изд. 2-е, доп. и перераб., Л.: Машиностроение, 1975. – 312 с.
43. Энциклопедия физики и техники [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://femto.com.ua/articles/part_2/3787.html
44. Сущинский М.М. Вынужденное рассеяние света. М.: Наука, 1985. 176 с.
45. Geim, A.K.; Novoselov, K.S. The rise of graphene. Nat. Mater. 2007, 6, 183-191
46. Wilhelm S., Grobler d., Gluch M., Heinz H. Confocal Laser Scanning Microscopy [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf>
47. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб: ИНЦ РАН, 2007. 77 с.
48. Micro-shop [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.micro-shop.zeiss.com/en/eg/system>
49. LSM780 [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.zeiss.de/LSM780
50. Capskii S. Theorie der optischen Instrumente nach Abbe. Jena, 1893.
51. Гуриков В.А. Эрнст Аббе. М.: Наука, 1985. 228 с.
52. Барский И.Я., Поляков Н.И., Якубенас В.А.В. Контактная микроскопия. М.: Медицина, 1976. 159 с.
53. Верцнер В.Н. Электронная микроскопия и новые методы исследования микроструктур. // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. С. 117 – 154.
54. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие. Нижний Новгород.: Институт физики наноструктур, 2004. 114 с.
55. Жданов Г.С., Либенсон М.Н. Марциновский Г.А. Ближнеполюсная оптика. Учебное пособие. СПб: СПб ГИТМО (ТУ), 2006. 109 с.
56. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1970. 855 с.
57. Силимено С., Крозиньяни Б., П. Ди Порто. Дифракция и волновое распространение оптического излучения. М.: Мир, 1989. 662 с.
58. Бутакова С.В. Аналитические методы в теории дифракции и распространения волн. М.: Министерство радиопромышленности, 1970. 330 с.

59. Куюмждан Р. Методы высокочастотной асимптотики //ТИИЭР. 1985. т.53. № 8. С. 994 – 1000.
60. Geometric theory of diffraction. New York.: IEEE Press, 1981. 405p.
61. IGate [Электронный ресурс]. Режим доступа:
<https://igate.com.ua/news/12909-umer-marvin-li-minskij-chelovek-bez-kotorogo-mir-byl-by-drugim>

Галина Николаевна Виноградова
Виктор Валерьевич Захаров

Основы микроскопии, часть 2

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49