

## 1.10. МЕТОДЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

**Цель лекции:** *изучение принципов световой микроскопии.*

### 1.10.1. МЕТОД СВЕТЛОГО ПОЛЯ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ

Этот метод применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями. Это могут быть, например, тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие шлифы минералов и т. д. В отсутствие препарата пучок света из конденсора, проходя через объектив, дает вблизи фокальной плоскости окуляра равномерно освещенное поле. При наличии в препарате абсорбирующего элемента происходит частичное поглощение и частичное рассеивание падающего на него света, что и обуславливает появление изображения. Возможно применение метода и при наблюдении неабсорбирующих объектов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив.

**Метод косо́го освещения** – разновидность предыдущего метода. Отличие между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом к направлению наблюдения. Иногда это помогает выявить «рельефность» объекта за счет образования теней.

**Метод светлого поля в отраженном свете** применяется при исследовании непрозрачных, отражающих свет объектов, например шлифов металлов или руд. Освещение препарата (от осветителя и полупрозрачного зеркала) производится сверху, через объектив, который одновременно играет и роль конденсора. В изображении, создаваемом в плоскости объективом совместно с тубусной линзой, структура препарата видна из-за различия в отражающей способности ее элементов; на светлом поле выделяются также неоднородности, рассеивающие падающий на них свет.

### 1.10.2. МЕТОД ТЕМНОГО ПОЛЯ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ

Данный метод используется для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, которые не могут быть видны, если применить метод светлого поля. Зачастую это биологические объекты. Свет от осветителя и зеркала направляется на препарат конденсором специальной конструкции – так называемым конденсором темного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив, который находится внутри этого конуса. Изображение в микро-

скопе формируется при помощи лишь небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутрь конуса и прошедшими через объектив. В поле зрения на темном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. Используя этот метод, нельзя определить по виду изображения, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

### 1.10.3. МЕТОД УЛЬТРАМИКРОСКОПИИ

В основе метода ультрамикроскопии лежит тот же принцип – препараты в ультрамикроскопах освещаются перпендикулярно направлению наблюдения. При этом методе можно обнаружить (но не «наблюдать» в буквальном смысле слова) чрезвычайно мелкие частицы, размеры которых лежат далеко за пределами разрешающей способности наиболее сильных микроскопов. При помощи иммерсионных ультрамикроскопов удается зарегистрировать присутствие в препарате частицы размером  $10^{-9}$  м. Но форму и точные размеры таких частиц с помощью этого метода определить невозможно. Их изображения представляются наблюдателю в виде дифракционных пятен, размеры которых зависят не от размеров и формы самих частиц, а от апертуры объектива и увеличения микроскопа. Так как подобные частицы рассеивают очень мало света, то для их освещения требуются чрезвычайно сильные источники света, например угольная электрическая дуга. Ультрамикроскопы применяются в основном в коллоидной химии.

Непрозрачные препараты (например, шлифы металлов), наблюдаемые по методу темного поля в отраженном свете, освещают сверху – через специальную кольцевую систему, расположенную вокруг объектива и называемую эпиконденсором.

### 1.10.4. ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

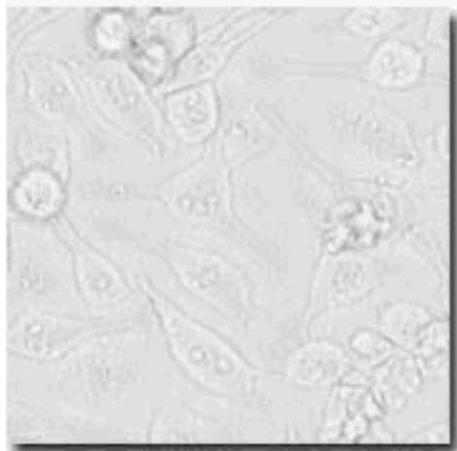
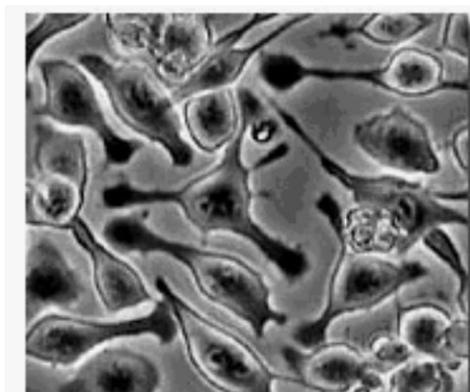
Поляризационная микроскопия – это метод наблюдения в поляризованном свете для микроскопического исследования препаратов, включающих оптически анизотропные элементы (или целиком состоящих из таких элементов). Таковыми являются многие минералы, зерна в сплавах, некоторые животные и растительные ткани и пр. Оптические свойства анизотропных микрообъектов различны в различных направлениях и проявляются по-разному в зависимости от ориентации этих объектов относительно направления наблюдения и плоскости поляризации света, падающего на них. Наблюдение можно проводить как в проходящем, так и в отраженном свете. Свет, излучаемый осветителем, пропускают через поляризатор. Сообщенная ему при этом поляризация меняется при последующем прохождении света через

препарат (или отражении от него). Эти изменения изучаются с помощью анализатора и различных оптических компенсаторов. Анализируя такие изменения, можно судить об основных оптических характеристиках анизотропных микрообъектов: силе двойного лучепреломления, количестве оптических осей и их ориентации, вращении плоскости поляризации, дихроизме.

### 1.10.5. МЕТОД ФАЗОВОГО КОНТРАСТА

Метод фазового контраста и его разновидность – так называемый метод «аноптрального» контраста предназначен для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля. К таковым относятся, например, живые неокрашенные животные ткани. Суть метода в том, что даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе (приобретает так называемый фазовый рельеф). Не воспринимаемые непосредственно ни глазом, ни фотопластинкой, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости («амплитудный рельеф»), которые уже различимы глазом или фиксируются на фоточувствительном слое. Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным (рис. 1.73).

Типичная схема работы метода: в переднем фокусе конденсора устанавливается апертурная диафрагма, отверстие которой имеет форму кольца. Ее изображение возникает вблизи заднего фокуса объектива, и там же устанавливается так называемая фазовая пластинка, на поверхности которой имеется кольцевой выступ или кольцевая канавка, называемая фазовым кольцом. Фазовая пластинка не всегда помещена в фокусе объектива – часто фазовое кольцо ставят прямо на поверхность одной из линз объектива. В любом случае неотклоненные в препарате лучи от осветителя, дающие изображение диафрагмы, должны полностью проходить через фазовое кольцо, которое значительно ослабляет их (его делают поглощающим) и изменяют их фазу на  $\lambda/4$  – длина волны света. А лучи, отклоненные (рассеянные) в препарате, проходят через фазовую пластинку, минуя фазовое кольцо, и не претерпевают дополнительного сдвига фазы. С учетом фазового сдвига в материале препарата полная разность фаз между отклоненными и неотклоненными лучами близка к 0 или  $\lambda/2$ , и в результате интерференции света в плоскости изображения препарата они заметно усиливают или ослабляют друг друга, давая контрастное изображение структуры препарата. Отклоненные лучи имеют значительно меньшую амплитуду по сравнению с неотклоненными, поэтому ослабление основного пучка в фазовом кольце, сближая значения амплитуд, также приводит к большей контрастности изображения.

*a**б*

**Рис. 1.73.** Пример измерения методом фазового контраста: клетки, освещенные по методу светлого поля (*a*) и методу фазового контраста (*б*)

Метод дает возможность различать малые элементы структуры, чрезвычайно слабо контрастные в методе светлого поля. Прозрачные частицы, сравнительно немалые по размерам, рассеивают лучи света на столь небольшие углы, что эти лучи проходят вместе с неотклоненными через фазовое кольцо. Для таких частиц фазово-контрастный эффект имеет место только вблизи их контуров, где происходит сильное рассеяние.

### 1.10.6. МЕТОД ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО КОНТРАСТА

Метод интерференционного контраста состоит в том, что каждый луч раздваивается, входя в микроскоп. Один из полученных лучей направляется сквозь наблюдаемую частицу, другой – мимо нее по той же или дополнительной оптической ветви микроскопа. В окулярной части микроскопа оба луча вновь соединяются и интерферируют между собой.

Результат интерференции определяется разностью хода лучей  $\delta$  ( $\delta = (n_0 - n_m)d$ , где  $n_0, n_m$  – показатели преломления частицы и окружающей среды;  $d$  – толщина частицы), по формуле  $\lambda = N\delta$ , где  $N$  – так называемый порядок;  $\lambda$  – длина волны света. Опишем схему одного из способов интерференции – осуществления интерференционного контраста. Конденсор и объектив снабжены двоякопреломляющими пластинками, из которых первая расщепляет исходный световой луч на два луча, а вторая воссоединяет их. Один из лучей, проходя через объект, запаздывает по фазе (приобретает разность хода по сравнению со вторым лучом). Величина этого запаздывания измеряется компенсатором. Можно сказать, что метод интерференционного контраста сходен с методом фазового контраста – они оба основаны на интерференции лучей, прошедших через микрочастицу и миновавших ее. Как и фазово-контрастная микроскопия, этот метод дает возможность наблюдать прозрачные и бесцветные объекты, но их изображения могут быть и разноцветными (интерференционные цвета). Оба метода пригодны для изучения живых тканей и клеток и применяются во многих случаях именно с этой целью. Главное отличие интерференционной микроскопии от метода фазового контраста – это возможность, используя компенсаторы, с высокой точностью измерять разности хода, вносимые микрообъектами, с точностью до  $1/300\lambda$ . Это дает широкие возможности количественных исследований – на основании таких измерений могут быть рассчитаны общая масса и концентрация сухого вещества в микрообъекте (например, в растительной или животной клетке), показатель преломления и размеры объекта. Метод интерференционного контраста часто применяют совместно с другими методами микроскопии, в частности с наблюдением в поляризованном свете. Его применение в сочетании с микроскопией в ультрафиолетовых лучах позволяет, к примеру, определить содержание нуклеиновых кислот в общей сухой массе объекта. К интерференционной микроскопии относятся также методы использования микроинтерферометров.

### 1.10.7. МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ В СВЕТЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Люминесцентная микроскопия, или флюоресцентная микроскопия, состоит в наблюдении под микроскопом зелено-оранжевого свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении сине-фиолетовым светом или невиди-

мыми глазом ультрафиолетовыми лучами. В оптическую схему микроскопа вводятся два светофильтра. Один из них помещают перед конденсором. Он пропускает от источника-осветителя излучение только тех длин волн, которые возбуждают люминесценцию либо самого объекта (собственная люминесценция), либо специальных красителей, введенных в препарат и поглощенных его частицами (вторичная люминесценция). Второй светофильтр, который установлен после объектива, пропускает к глазу наблюдателя (или на фоточувствительный слой) только свет люминесценции. В люминесцентной микроскопии используют освещение препаратов как сверху (через объектив, который в этом случае служит и конденсором), так и снизу, через обычный конденсор. Наблюдение при освещении сверху иногда называют «люминесцентной микроскопией в отраженном свете» (этот термин условен – возбуждение свечения препарата не является простым отражением света). Его часто используют совместно с наблюдением по фазово-контрастному методу в проходящем свете.

Метод нашел широкое применение в микробиологии, вирусологии, гистологии, цитологии, в пищевой промышленности, при исследовании почв, в микрохимическом анализе, в дефектоскопии. Такое многообразие применений объясняется очень высокой цветовой чувствительностью глаза и высокой контрастностью изображения самосветящегося объекта на темном нелюминесцирующем фоне. Кроме того, информация о составе и свойствах исследуемых веществ, которую можно получить, зная интенсивность и спектральный состав их люминесцентного излучения, имеет огромную ценность.

### 1.10.8. МЕТОД НАБЛЮДЕНИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ (УФ) ЛУЧАХ

Данный метод делает возможным увеличение предельной разрешающей способности микроскопа, т. е. предлагаемый метод позволяет понизить предельное разрешение применяемого микроскопа, которое зависит от длины волны, путем использования  $\lambda = 400 \div 250$  нм, тогда как для используемых в микроскопии

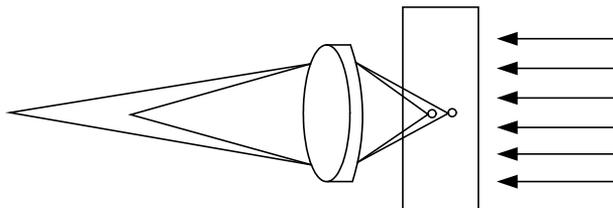
УФ-лучей видимого света  $\lambda = 700 \div 400$  нм. Но главное преимущество метода состоит в том, что частицы многих веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ-излучение определенных длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ-изображениях. Характерными спектрами поглощения в УФ-области обладают многие вещества, содержащиеся в растительных и животных клетках (пуриновые основания, пиримидиновые основания, большинство витаминов, ароматические аминокислоты, некоторые липиды, тироксин и др.). Этим обусловлено широкое применение УФ-микроскопии в качестве одного из методов цитохимического анализа.

Так как ультрафиолетовые лучи невидимы для человеческого глаза, то изображения в УФ-микроскопии регистрируют либо фотографически, либо с помощью электроннооптического преобразователя или люминесцирующего экрана. Опишем один из наиболее распространенных способов цветового

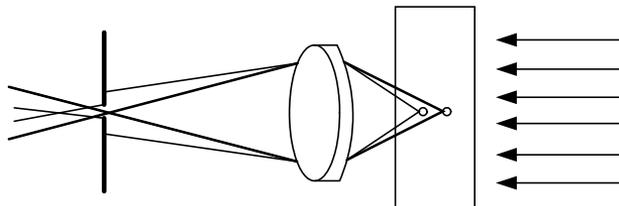
представления таких изображений. Препарат фотографируется в трех длинах волн УФ-области спектра. Каждый из полученных негативов освещается видимым светом определенного цвета (например, синим, зелёным и красным), и все они одновременно проецируются на один экран. Результат – цветное изображение объекта в условных цветах, зависящих от поглощающей способности препарата в ультрафиолете.

### 1.10.3. КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

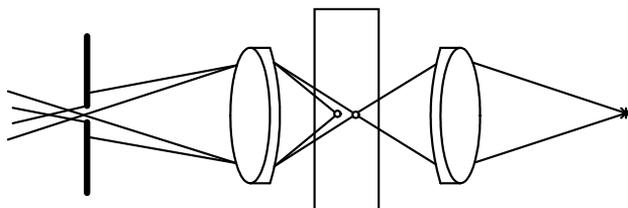
Конфокальный микроскоп отличается от «классического» оптического микроскопа (рис. 1.74), тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы). Для того чтобы регистрировать свет только от одной точки, после объективной линзы располагается диафрагма малого размера таким образом, что свет, испускаемый анализируемой точкой (красные лучи на рис. 1.75), проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет от остальных точек (например, синие лучи на рис. 1.75) в основном задерживается диафрагмой. Вторая особенность состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку (рис. 1.76). Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, но при этом требуется, чтобы образец был прозрачным. Кроме того, объективные линзы обычно сравнительно дорогие, поэтому использование второй фокусирующей системы для подсветки мало предпочтительно. Альтернативой является использование светоделительной пластинки, так чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом (рис. 1.77). Такая схема к тому же облегчает юстировку.



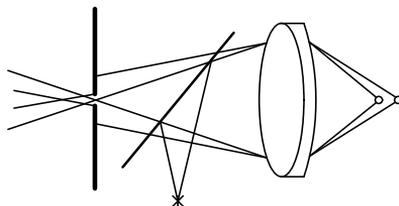
**Рис. 1.74.** Ход лучей в обычном оптическом микроскопе, когда в фотоприемное устройство попадает свет из различных точек образца



**Рис. 1.75.** Применение диафрагмы позволяет существенно снизить фоновую подсветку от точек образца вне анализируемой области



**Рис. 1.76.** Дополнительное повышение контраста достигается применением подсветки, фокусирующей свет в анализируемую точку



**Рис. 1.77.** Схема со светоделительной пластинкой упрощает конструкцию микроскопа и процесс юстировки за счет двойного использования объектива (для подсветки и сбора отраженного сигнала)

Качественно понятно, что применение конфокальной схемы должно приводить к увеличению контрастности изображения, за счет того, что «паразитный» свет от точек, соседних с анализируемой, перестает попадать в детектор. Платой за увеличение контрастности будет необходимость применения достаточно сложных схем сканирования либо образцом, либо световым пучком. Детальное рассмотрение существующих технических решений построения конфокальных микроскопов выходит за рамки данного раздела [43].

**Разрешение и контрастность в конфокальном микроскопе.** Рассмотрим теперь математически, каким образом и насколько количественно изменяется контрастность при применении конфокальной микроскопии. Во-первых, так как в конфокальном микроскопе свет дважды проходит через объектив, то функция размытия точки (далее обозначаемая PSF) имеет вид:

$$p_{conf}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho). \quad (1.48)$$

Для качественного понимания удобно рассматривать каждую PSF как вероятность того, что фотон либо попадет в точку с координатами  $(\zeta, \rho)$ , либо фотон будет зарегистрирован из точки с координатами  $(\zeta, \rho)$ ; тогда конфокальная PSF есть произведение независимых вероятностей. На рис. 1.78 приведены изображения обычной PSF и конфокальной PSF.

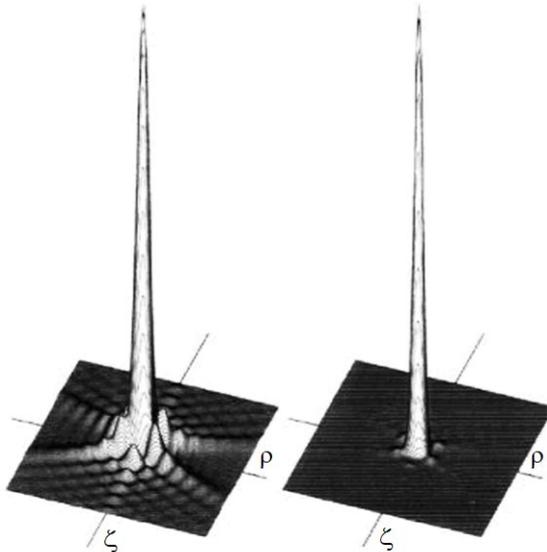
Если использовать критерий Релея для разрешения (провал 26% от максимума распределения), то мы получим, что разрешение в конфокальном микроскопе увеличивается, но не существенно. Для конфокального микроскопа:

$$r_{conf} = 0,44 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 0,88 \frac{\lambda'}{D} F, \quad (1.49)$$

в то время как для обычного микроскопа:

$$r_{resel} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 1,22 \frac{\lambda'}{D} F, \quad (1.50)$$

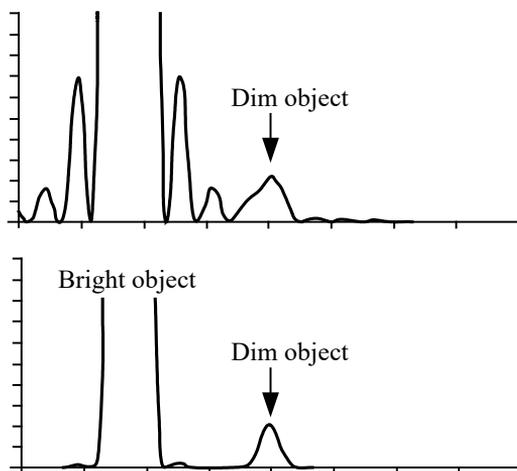
где:  $\lambda' = \frac{\lambda}{n}$ .



**Рис. 1.78.** Конфокальная PSF  $p_{conf}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho)$  показана справа, а обычная PSF  $p(\zeta, \rho)$  – слева

Однако основным достоинством конфокального микроскопа является не увеличение разрешения в смысле критерия Релея, а существенное увеличение контрастности. В частности, для обычной PSF в фокальной плоскости отношение амплитуды в первом боковом максимуме к амплитуде в центре составляет 2%, для случая конфокального микроскопа это отношение будет 0,04%. На рис. 1.79 приведен практический пример, когда это важно. На верхней части рисунка мы видим, что тусклый объект (интенсивность в 200 раз меньше, чем у яркого) невозможно обнаружить в обычный микроскоп, хотя расстояние

между объектами существенно больше того, что предписано критерием Релея. В то же самое время в конфокальный микроскоп (нижняя часть рис. 1.79) данный объект должен хорошо регистрироваться.



**Рис. 1.79.** Распределение интенсивности для случая обычного микроскопа (верхний рисунок) и конфокального микроскопа (нижний рисунок). Максимум интенсивности тусклого объекта в 200 раз меньше, чем интенсивность яркого

Распределение интенсивности вдоль оптической оси для конфокального микроскопа определяется выражением:

$$p_{conf}(\zeta, 0) \approx \left( \frac{\sin\left(\frac{\zeta}{4}\right)}{\frac{\zeta}{4}} \right)^4. \quad (1.51)$$

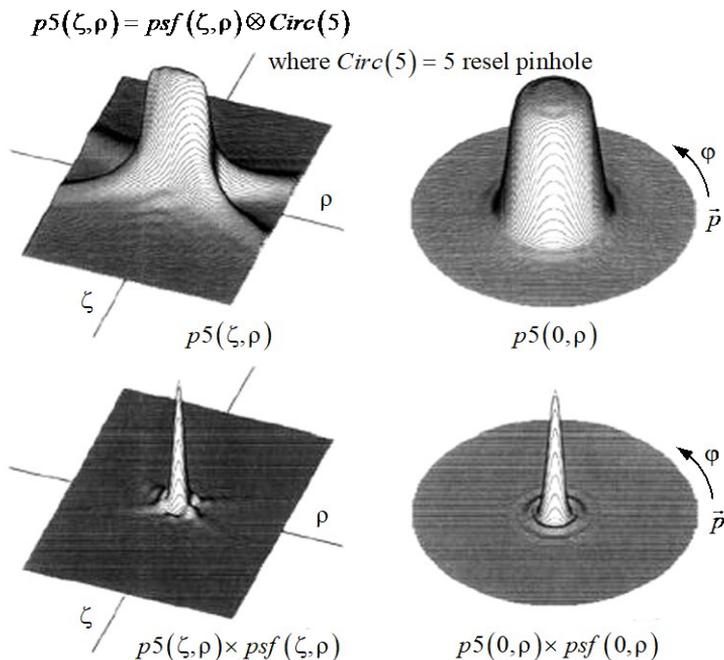
Тогда, пользуясь критерием Релея, получим разрешение вдоль оптической оси:

$$\Delta z_{conf} = 1,5 \frac{\lambda}{n \sin^2 \theta} = 1,5 \frac{n\lambda}{NA^2} = 6\lambda' \left( \frac{F}{D} \right)^2. \quad (1.52)$$

Здесь важно отметить, что не следует путать разрешение вдоль оптической оси и глубину фокуса в обычном микроскопе. Обычно глубина фокуса в сотни раз превышает разрешение вдоль оптической оси [43].

**Влияние диафрагмы в фокальной плоскости.** Один из параметров, который никак не фигурировал в данном выше описании, – это размер диафрагм в фокальной плоскости облучающей и собирающей линз. Отметим, что при анализе мы молчаливо предполагали источник точечным и именно в этом предположении получили функцию размытия точки (PSF) для обычного и конфокального микроскопа. Полученные PSF описывают свойства объективной линзы, а изображение диафрагмы в плоскости объекта определяет, свет из каких областей регистрируется фотодетектором. Очевидно, однако, что

уменьшение размера диафрагмы приводит к уменьшению количества проходящего света, увеличивает уровень шума и, в конечном итоге, может свести на нет все достигнутые преимущества по контрастности. Таким образом, стоит вопрос об оптимальном выборе размера диафрагмы и разумном компромиссе.



**Рис. 1.80.** Функции размытия точки для обычного микроскопа с диафрагмой размером 5 пятен Эйри (верхние рисунки) и для конфокального микроскопа (нижние рисунки)

Диафрагма с отверстием меньше размера пятна Эйри просто приводит к потере интенсивности и никак не влияет на разрешение. Диафрагма размером в одно пятно Эйри позволяет по максимуму использовать разрешающую способность объективной линзы. Однако размер диафрагмы примерно в 3–5 раза больше пятна Эйри представляется наиболее подходящим компромиссом. Следует понимать, что обсуждаемый здесь размер имеет смысл размера изображения в плоскости объекта, а поэтому реальный размер отверстия в диафрагме зависит от увеличения линзы. В частности, при использовании 100-кратной линзы диафрагма с отверстием 1 мм будет спроецирована в плоскость объекта в круг радиусом 10 мкм.

Для того чтобы учесть наличие диафрагмы математически и построить новую функцию распределения интенсивности, следует выполнить свертку:

$$P(\rho, \zeta) = p \otimes S = \int p(\rho - \rho_s, \zeta) S(\rho_s, \phi_s) \rho_s d\phi_s d\rho_s, \quad (1.53)$$

а для конфокального микроскопа уже полученную функцию  $P(\rho, \zeta)$  умножать на  $p(\rho, \zeta)$ . Результирующее распределение интенсивности для случая диафрагмы с размером 5 пятен Эйри приведено на рис. 1.80.

Конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения подсветки сфокусированной объективной линзой в область анализа и размещения диафрагмы в плоскости наблюдения перед фотодетектором. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1.

В конфокальной микроскопии несколько улучшается разрешение в плоскости объекта (в 1,5 раза) и достигается высокое разрешение вдоль оптической оси.

Платой за полученные улучшения является необходимость применения схем сканирования – либо путем перемещения образца, либо путем перестройки оптической системы. Применение сканирования позволяет увеличить поле зрения по сравнению с обычными оптическими микроскопами.

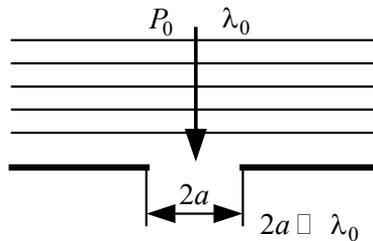
#### 1.10.4. СКАНИРУЮЩАЯ БЛИЖНЕПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Традиционные методы получения оптических изображений объектов имеют существенные ограничения, связанные с дифракцией света. Одним из основополагающих законов оптики является существование так называемого дифракционного предела, который устанавливает минимальный размер  $R$  объекта, изображение которого может быть построено оптической системой при использовании света с длиной волны  $\lambda$ :

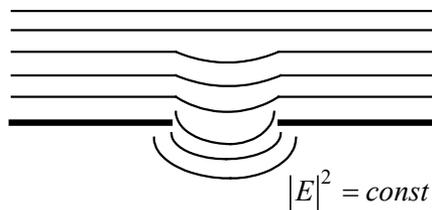
$$R \approx \frac{\lambda}{2n}, \quad (1.54)$$

где:  $n$  – показатель преломления среды. Для оптического диапазона длин волн предельный размер составляет величину порядка 200–300 нм.

В **ближнепольной оптической микроскопии** используются другие принципы построения изображения объекта, которые позволяют преодолеть трудности, связанные с дифракцией света, и реализовать пространственное разрешение на уровне 10 нм и лучше. Ближнепольный оптический микроскоп (БОМ) был изобретен Дитером Полем (лаборатория фирмы ИВМ, г. Цюрих, Швейцария) в 1982 г. сразу вслед за изобретением туннельного микроскопа. В основе работы данного прибора используется явление прохождения света через *субволновые диафрагмы* (отверстия с диаметром много меньше длины волны падающего излучения) (рис. 1.81).



**Рис. 1.81.** Прохождение света через отверстие в экране с субволновой апертурой



**Рис. 1.82.** Линии постоянной интенсивности оптического излучения в области субволнового отверстия

При прохождении света через субволновое отверстие наблюдается ряд особенностей. Электромагнитное поле в области диафрагмы имеет сложную структуру. Непосредственно за отверстием на расстояниях  $Z < 100 \text{ \AA}$  располагается так называемая *ближняя зона*, в которой электромагнитное поле существует в основном в виде эванесцентных (не распространяющихся) мод, локализованных вблизи поверхности диафрагмы (рис. 1.82). В области расстояний  $Z > 100 \text{ \AA}$  располагается *дальняя зона*, в которой наблюдаются лишь излучательные моды. Мощность излучения за субволновой диафрагмой в дальней зоне может быть оценена по следующей формуле:

$$P_{tr} = \frac{128}{47\pi} k^4 a^6 W_0, \quad (1.55)$$

где:  $k$  – волновой вектор,  $W_0$  – плотность мощности падающего излучения.

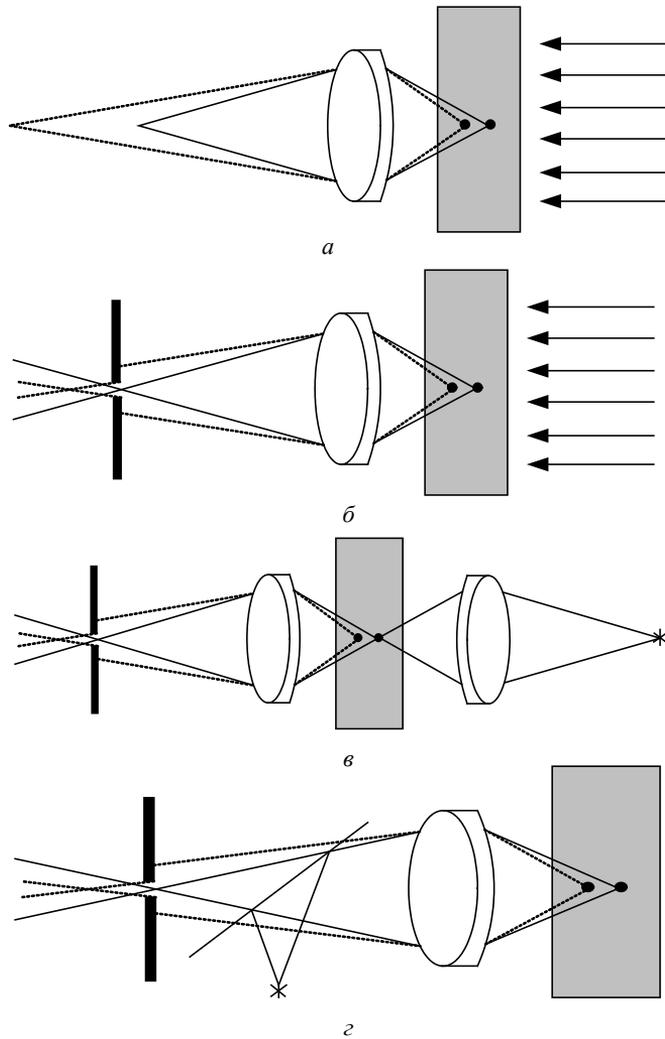
Оценки показывают, что для излучения с длиной волны порядка 500 нм и диафрагмы с отверстием  $\sim 5$  нм мощность излучения в дальней зоне составляет по порядку величин  $10^{-10}$  от мощности падающего излучения. Поэтому, на первый взгляд, кажется, что использование малых отверстий для построения растровых оптических изображений исследуемых образцов практически невозможно. Однако если поместить исследуемый объект непосредственно за отверстием в ближней зоне, то вследствие взаимодействия эванесцентных мод с образцом часть энергии электромагнитного поля переходит в излучательные моды, интенсивность которых может быть зарегистрирована оптическим фотоприемником.

Таким образом, ближнепольное изображение формируется при сканировании исследуемого образца диафрагмой с субволновым отверстием и регистрируется в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы  $I(x, y)$ . Контраст на БОМ-изображениях определяется процессами отражения, преломления, поглощения и рассеяния света, которые, в свою очередь, зависят от локальных оптических свойств образца [43].

Ближнепольное изображение формируется при сканировании исследуемого образца диафрагмой с субволновым отверстием и регистрируется в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы.

### 1.10.5. Виды микроскопов: КОНФОКАЛЬНЫЙ МИКРОСКОП

Конфокальный микроскоп отличается от классического оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы). Для того чтобы регистрировать свет только от одной точки, за объективной линзой располагается диафрагма малого размера таким образом, что свет, испускаемый анализируемой точкой (рис. 1.83, *a*), проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет от остальных точек (рис. 1.83, *b*) в основном задерживается диафрагмой. Вторая особенность состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку (рис. 1.83, *в*). Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, но при этом требуется, чтобы образец был прозрачным. Кроме того, объективные линзы обычно сравнительно дорогие, поэтому использование второй фокусирующей системы для подсветки мало предпочтительно. Альтернативой является использование светоделительной пластинки, так, чтобы и падающий и отраженный свет фокусировались одним объективом (рис. 1.83, *г*). Такая схема к тому же облегчает юстировку.



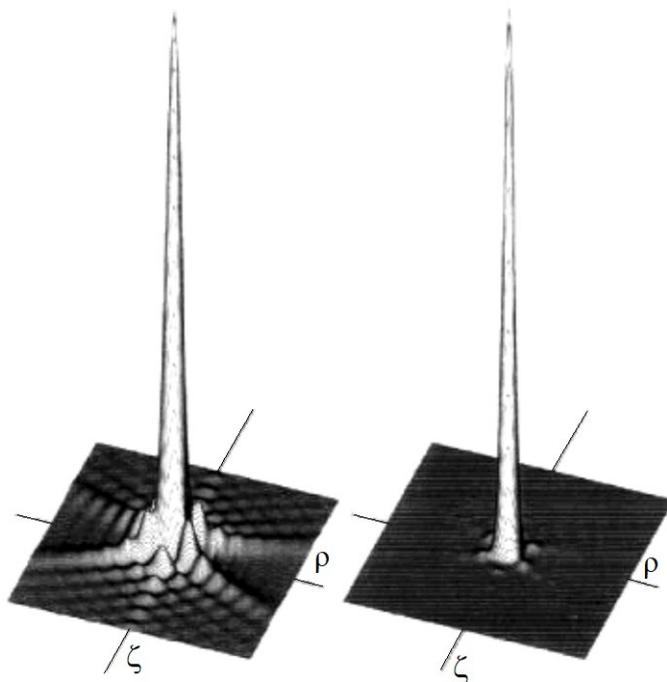
**Рис. 1.83.** Оценка освещенности поля зрения

- a* – ход лучей в обычном оптическом микроскопе, когда в фотоприемное устройство попадает свет из различных точек образца;
- б* – применение диафрагмы позволяет существенно снизить фоновую подсветку от точек образца вне анализируемой области;
- в* – дополнительное повышение контраста достигается применением подсветки, фокусирующей свет в анализируемую точку;
- г* – схема со светоделительной пластинкой упрощает конструкцию микроскопа и процесс юстировки за счет двойного использования объектива (для подсветки и сбора отраженного сигнала)

Понятно, что применение конфокальной схемы должно приводить к увеличению контрастности изображения, за счет того, что «паразитный» свет от точек, соседних с анализируемой, перестает попадать в детектор. Платой за увеличение контрастности будет необходимость применения достаточно сложных схем сканирования либо образцом, либо световым пучком. Детальное рассмотрение существующих технических решений построения конфокальных микроскопов выходит за рамки данного раздела.

Рассмотрим теперь математически, каким образом и насколько количественно изменяется разрешение и контрастность при применении конфокальной микроскопии. Во-первых, так как в конфокальном микроскопе свет дважды проходит через объектив, то функция размытия точки (далее обозначаемая PSF) имеет вид:

$$p_{conf}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho). \quad (1.48)$$



**Рис. 1.84.** Конфокальная PSF  $p_{conf}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho)$  показана справа, а обычная PSF  $p(\zeta, \rho)$  – слева

Для качественного понимания удобно рассматривать каждую PSF как вероятность того, что фотон попадет в точку с координатами  $(\zeta, \rho)$ , либо фотон будет зарегистрирован из точки с координатами  $(\zeta, \rho)$ , тогда конфокальная

PSF есть произведение независимых вероятностей. На рис. 1.84 приведено изображение обычной PSF и конфокальной PSF.

Если использовать критерий Рэля для разрешения (провал 26% от максимума распределения), то мы получим, что разрешение в конфокальном микроскопе увеличивается, но не существенно. Для конфокального микроскопа

$$r_{conf} = 0,44 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 0,88 \frac{\lambda'}{D}, \quad (1.56)$$

в то время как для обычного микроскопа

$$r_{resel} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 1,22 \frac{\lambda'}{D}, \quad (1.57)$$

где:  $\lambda' = \lambda/n$ .

Однако основным достоинством конфокального микроскопа является не увеличение разрешения в смысле критерия Рэля, а существенное увеличение контрастности. В частности, для обычной PSF в фокальной плоскости отношение амплитуды в первом боковом максимуме к амплитуде в центре составляет 2%, для случая конфокального микроскопа это отношение будет 0,04%. На рис. 1.85 приведен практический пример, когда это важно. На верхней части рисунка мы видим, что тусклый объект (интенсивность в 200 раз меньше, чем у яркого) невозможно обнаружить в обычный микроскоп, хотя расстояние между объектами существенно больше того, что предписано критерием Рэля. В то же время в конфокальный микроскоп (нижняя часть рис. 1.85) данный объект должен хорошо регистрироваться.

Распределение интенсивности вдоль оптической оси для конфокального микроскопа определяется выражением:

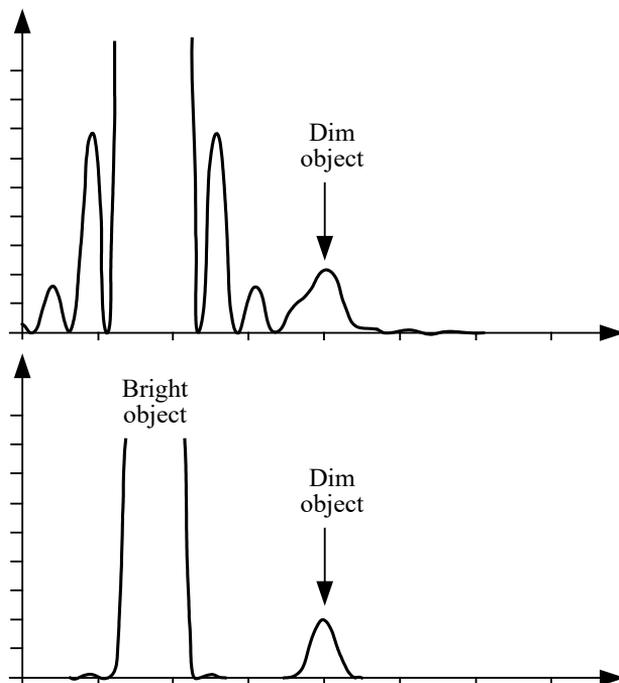
$$p_{conf}(\zeta, 0) \approx \left( \frac{\sin(\frac{\zeta}{4})}{\frac{\zeta}{4}} \right)^4. \quad (1.58)$$

Тогда, пользуясь критерием Рэля, получим разрешение вдоль оптической оси:

$$\Delta z_{conf} = 1,5 \frac{\lambda}{n \sin^2 \theta} = 1,5 \frac{n\lambda}{NA^2} = 6\lambda' \left( \frac{F}{D} \right)^2, \quad (1.59)$$

где:  $F$  – передний фокус.

Здесь важно отметить, что не следует путать разрешение вдоль оптической оси и глубину фокуса в обычном микроскопе. Обычно глубина фокуса в сотни раз превышает разрешение вдоль оптической оси.



**Рис. 1.85.** Распределение интенсивности для случая обычного микроскопа (верхний рисунок) и конфокального микроскопа (нижний рисунок). Максимум интенсивности тусклого объекта в 200 раз меньше, чем интенсивность яркого

Один из параметров, который никак не фигурировал в данном выше описании, – это размер диафрагм в фокальной плоскости облучающей и собирающей линз. Отметим, что при анализе мы молчаливо предполагали источник точечным и именно в этом предположении получили функцию размытия точки (PSF) для обычного и конфокального микроскопа. Полученные PSF описывают свойства объективной линзы, а изображение диафрагмы в плоскости объекта определяет, свет из каких областей регистрируется фотодетектором. Очевидно, однако, что уменьшение размера диафрагмы приводит к уменьшению количества проходящего света, увеличивает уровень шума и, в конечном итоге, может свести на нет все достигнутые преимущества по контрастности. Таким образом, стоит вопрос об оптимальном выборе размера диафрагмы и разумном компромиссе.

Диафрагма с отверстием меньше размера пятна Эйри просто приводит к потере интенсивности и никак не влияет на разрешение. Диафрагма размером в одно пятно Эйри позволяет по максимуму использовать разрешающую способность объективной линзы. Однако размер диафрагмы примерно в 3–5 раза больше пятна Эйри представляется наиболее подходящим компромиссом. Следует понимать, что обсуждаемый здесь размер имеет смысл размера изображе-

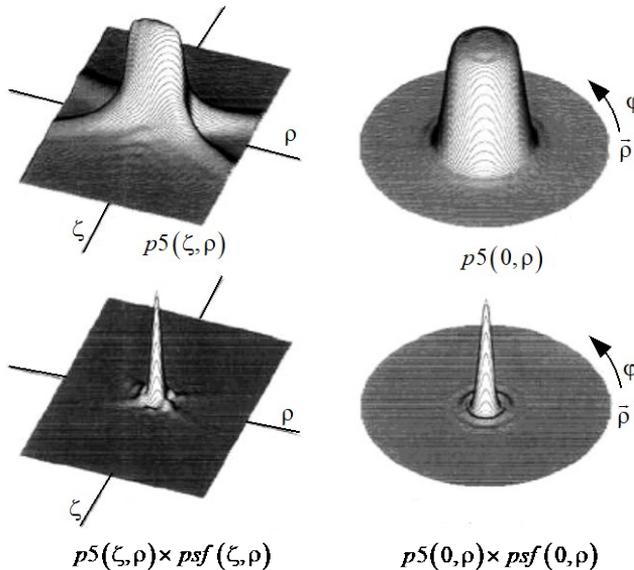
ния в плоскости объекта, а поэтому реальный размер отверстия в диафрагме зависит от увеличения линзы. В частности, при использовании 100-кратной линзы диафрагма с отверстием 1 мм будет спроецирована в плоскость объекта в круг радиусом 10 мкм.

Для того чтобы учесть наличие диафрагмы математически и построить новую функцию распределения интенсивности, следует выполнить свертку:

$$P(\rho, \zeta) = p \otimes S = \int p(\rho - \rho_S, \zeta) S(\rho_S, \phi_S) d\phi_S d\rho_S, \quad (1.60)$$

а для конфокального микроскопа уже полученную новую функцию распределения интенсивности  $P(\rho, \zeta)$  умножить на исходную функцию распределения интенсивности  $p(\rho, \zeta)$ . В формуле приведены специализированные функции линз конфокального микроскопа. Результирующее распределение интенсивности для случая диафрагмы с размером 5 пятен Эйри приведено на рис. 1.86.

$$p^5(\zeta, \rho) \times psf(\zeta, \rho) \otimes Circ(5) \quad \text{where } Circ(5) = 5 \text{resel pinhole}$$



**Рис. 1.86.** Функции размытия точки для обычного микроскопа с диафрагмой размером 5 пятен Эйри (верхние рисунки) и для конфокального микроскопа (нижние рисунки)

Таким образом, конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения подсветки сфокусированной объективной линзой в область анализа и размещения диафрагмы в плоскости наблюдения перед фотодетектором. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200 : 1.

В конфокальной микроскопии несколько улучшается разрешение в плоскости объекта (в 1,5 раза) и достигается высокое разрешение вдоль оптической оси.

Платой за полученные улучшения является необходимость применения схем сканирования – либо путем перемещения образца, либо путем перестройки оптической системы. Применение сканирования позволяет увеличить поле зрения по сравнению с обычными оптическими микроскопами.

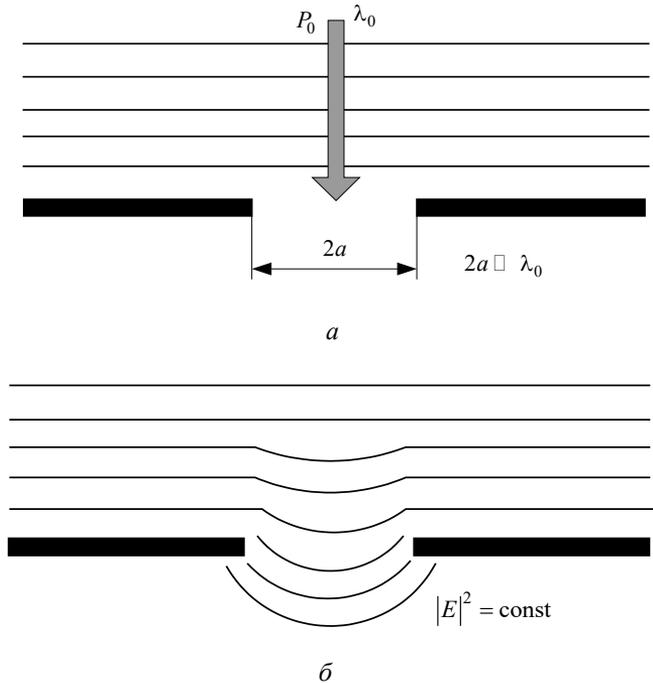
### 1.10.6. Виды микроскопов: Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия

Традиционные методы получения оптических изображений объектов имеют существенные ограничения, связанные с дифракцией света. Одним из основополагающих законов оптики является существование так называемого дифракционного предела, который устанавливает минимальный размер  $R$  объекта, изображение которого может быть построено оптической системой при использовании света с длиной волны  $\lambda$ :

$$R \approx \frac{\lambda}{2n}, \quad (1.61)$$

где:  $n$  – показатель преломления среды;  $\lambda$  – длина волны. Для оптического диапазона длин волн предельный размер составляет величину порядка 200–300 нм.

В ближнепольной оптической микроскопии используются другие принципы построения изображения объекта, которые позволяют преодолеть трудности, связанные с дифракцией света, и реализовать пространственное разрешение на уровне 10 нм и лучше. Ближнепольный оптический микроскоп (БОМ) был изобретен Дитером Полем (лаборатория фирмы ИВМ, г. Цюрих, Швейцария) в 1982 г. сразу вслед за изобретением туннельного микроскопа. В основе работы данного прибора используется явление прохождения света через субволновые диафрагмы (отверстия с диаметром много меньше длины волны падающего излучения) (рис. 1.87).



**Рис. 1.87.** *а* – прохождение света через отверстие в экране с субволновой апертурой; *б* – линии постоянной интенсивности оптического излучения в области субволнового отверстия

При прохождении света через субволновое отверстие наблюдается ряд особенностей. Электромагнитное поле в области диафрагмы имеет сложную структуру. Непосредственно за отверстием на расстояниях  $z < 100\text{Å}$  располагается так называемая ближняя зона, в которой электромагнитное поле существует в основном в виде эванесцентных (нераспространяющихся) мод, локализованных вблизи поверхности диафрагмы. В области расстояний  $z > 100\text{Å}$  располагается дальняя зона, в которой наблюдаются лишь излучательные моды. Мощность излучения за субволновой диафрагмой в дальней зоне может быть оценена по следующей формуле:

$$P_{tr} = \frac{128}{47\pi} k^4 a^6 W_0, \quad (1.62)$$

где:  $k$  – волновой вектор;  $W_0$  – плотность мощности падающего излучения;  $a$  – расстояние от передней главной точки до осевой точки предмета.

Оценки показывают, что для излучения с длиной волны порядка 500 нм и диафрагмы с отверстием 5 нм мощность излучения в дальней зоне составляет по порядку величин  $10^{-10}$  от мощности падающего излучения. Поэтому, на первый взгляд, кажется, что использование малых отверстий для построения растровых оптических изображений исследуемых образцов практически не-

возможно. Однако, если поместить исследуемый объект непосредственно за отверстием в ближней зоне, то вследствие взаимодействия эванесцентных мод с образцом часть энергии электромагнитного поля переходит в излучательные моды, интенсивность которых может быть зарегистрирована оптическим фотоприемником.

Таким образом, ближнепольное изображение формируется при сканировании исследуемого образца диафрагмой с субволновым отверстием и регистрируется в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы  $I(x, y)$ . Контраст на БОМ-изображениях определяется процессами отражения, преломления, поглощения и рассеяния света, которые, в свою очередь, зависят от локальных оптических свойств образца.

Ближнепольное изображение формируется при сканировании исследуемого образца диафрагмой с субволновым отверстием и регистрируется в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы.

### ТЕСТЫ К ЛЕКЦИИ

Вопрос 1	В каких случаях применяется метод светового поля в проходящем свете?
Ответы:	
1	При изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями
2	При изучении непрозрачных препаратов, хорошо отражающих падающий свет
3	При изучении светопоглощающих препаратов
Вопрос 2	В каких случаях применяется метод светлого поля в отраженном свете?
Ответы:	
1	При исследовании непрозрачных, отражающих свет объектов
2	При исследовании прозрачных, не отражающих свет объектов
3	При исследовании поглощающих свет объектов
Вопрос 3	В чем суть метода поляризационной микроскопии?
Ответы:	
1	Это метод наблюдения в поляризованном свете для микроскопического исследования препаратов, включающих оптически анизотропные элементы
2	Это метод, в котором используются поляризационные объективы
3	Это метод, в котором используются поляризационные окуляры

Вопрос 4	Для чего предназначен метод фазового контраста?
Ответы:	
1	Предназначен для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля
2	Предназначен для получения изображений непрозрачных объектов, путем их окрашивания фазоконтрастным красителем.
3	Предназначен для получения изображений объектов с высокой отражающей поверхностью, путем их окрашивания фазоконтрастным красителем.
Вопрос 5	В чем суть метода исследования в свете люминесценции?
Ответы:	
1	В наблюдении под микроскопом зелено-оранжевого свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении синевioletовым светом или невидимыми глазом ультрафиолетовыми лучами
2	В наблюдении под микроскопом красного свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении инфракрасным излучением
3	В наблюдении под микроскопом синего свечения микрообъектов, которое возникает при их облучении рентгеновским излучением
Вопрос 6	В чем главное преимущество метода наблюдения в ультрафиолетовых (УФ)лучах?
Ответы:	
1	Частицы многих веществ, прозрачных в видимом свете, сильно поглощают УФ-излучение определенных длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ-изображениях
2	Позволяет исследовать непрозрачные объекты в проходящих УФ-лучах
3	Позволяет исследовать прозрачные объекты в отраженном свете
Вопрос 7	Чем конфокальный микроскоп отличается от классического оптического микроскопа?
Ответы:	
1	В каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования
2	Позволяет исследовать сразу два объекта
3	Конфокальный микроскоп значительно проще по конструкции