



## ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРОСКОПА МЕТОДОМ АББЕ

### Лабораторная работа № 5.15

**Цель работы:** изучение дифракционного предела разрешения объектива микроскопа.

**В работе используются:** лазер; кассета с набором сеток разного периода; линзы; щель с микрометрическим винтом; оптический стол с набором рейтеров и крепёжных винтов; экран; линейка.

Всякая оптическая система, предназначенная для получения изображений, имеет конечный предел разрешения, т. е. ограниченную возможность раздельного наблюдения близких частей предмета. Принципиальной причиной, ограничивающей предел разрешения, является дифракция световых волн: ограничение пучка лучей краями линз и диафрагм, составляющих оптическую систему, приводит к нарушению *стигматичности* изображения — каждая точка предмета отображается не в одну точку, а в дифракционное пятно. Дифракционные пятна от близких точек предмета могут перекрываться друг другом, в результате чего точки становятся неразличимыми.

*Разрешающей способностью оптического прибора* называют минимальное расстояние  $l_{\min}$  между двумя точками в пространстве предметов, изображения которых разрешаются по критерию Релея (см. [1]).

Природа дифракционных искажений общая для всех оптических систем; мы рассмотрим для примера глаз, лупу и простейший объектив микроскопа, состоящий из одной линзы (разрешение оптических приборов определяется обычно дифракцией на объективе).

Оценим разрешающую способность глаза, полагая, что предмет (рис. 1) расположен на расстоянии наилучшего зрения  $L = 25$  см от зрачка диаметром  $d_0 = 5$  мм. Согласно критерию Релея глаз различает изображение точек как два объекта, если угловое расстояние между точками соответствует угловому размеру дифракционного пятна:

$$\frac{l_{\min}}{L} = \frac{\lambda}{d_0} \quad \text{или}$$
$$l_{\min} = \lambda \frac{L}{d_0} \approx \lambda \frac{25}{0,5} \approx 50\lambda.$$

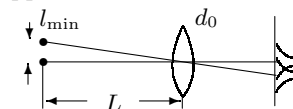


Рис. 1. Разрешающая способность глаза

Для  $\lambda \approx 6000 \text{ \AA}$  расчёт даёт  $l_{\min} \approx 30 \text{ мкм}$ .

Для лупы диаметром  $D_0$  с фокусным расстоянием  $f$  при настройке глаза на бесконечность

$$l_{\min} = \lambda \frac{f}{D_0}.$$

Для иммерсионного микроскопа (объект находится в иммерсионной среде — жидкости с показателем преломления  $n$ ) разрешающая способ-

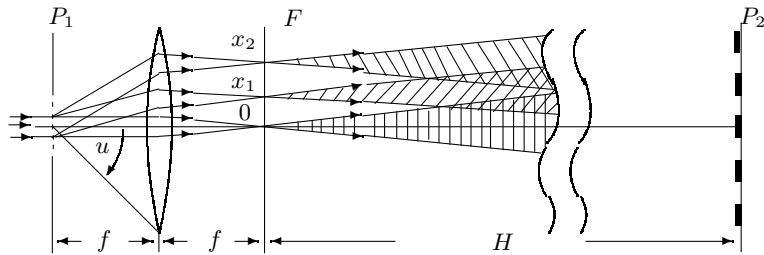


Рис. 2. Образование изображения в объективе микроскопа.  $P_1$  — плоскость предмета,  $F$  — задняя фокальная плоскость объектива,  $P_2$  — плоскость, сопряженная с предметной плоскостью. В плоскости  $P_2$  световые пучки сильно перекрываются

ность объектива

$$l_{\min} \approx \frac{0,61\lambda}{n \sin u} \approx \frac{\lambda}{2n \sin u},$$

где  $u$  — апертурный угол объектива микроскопа (см. рис. 2), т. е. угол между оптической осью и лучом, направленным из центра объекта в край линзы (напомним, что при наблюдении в микроскоп объект занимает небольшой участок, располагающийся вблизи оптической оси объектива). Вывод последней формулы предоставляем читателю.

Если наблюдения с помощью микроскопа ведутся при внешнем освещении, то, как правило, различные точки предмета рассеивают когерентные волны. Теория разрешающей способности для случая освещаемых объектов была разработана Аббе.

Схема образования изображения в объективе микроскопа представлена на рис. 2. Для простоты рассмотрим случай, когда предметом является периодическая структура (дифракционная решетка), освещаемая параллельным пучком лучей. При наблюдении в микроскоп предмет располагается вблизи переднего фокуса объектива.

Аббе предложил иной подход к оценке разрешающей способности: прохождение лучей от предмета к изображению разбивается на два этапа. Сначала рассматривается картина, возникающая в задней фокальной плоскости  $F$  объектива. Эта картина называется *первичным изображением* или *фурье-образом* предмета. Затем первичное изображение рассматривается как источник волн, создающих изображение предмета в плоскости  $P_2$ , сопряженной плоскости предмета, т. е. *вторичное изображение*. Такой подход основан на *принципе Гюйгенса–Френеля*, согласно которому любой участок волнового фронта можно рассматривать как вторичный источник излучения.

Легко понять, что первичное изображение, наблюдаемое в задней фокальной плоскости объектива, представляет собой картину дифракции

Фраунгофера на объекте (в нашем случае — на дифракционной решетке). Действительно, на решетку падает плоская волна, а каждая точка наблюдения в фокальной плоскости  $F$  линзы соответствует бесконечно удаленной точке. Смещение  $x_m$  точки наблюдения от оптической оси связано с углом наклона  $\varphi_m$  параллельного пучка лучей перед линзой соотношением (при малых  $\varphi$ ):  $x_m \approx f\varphi_m$ .

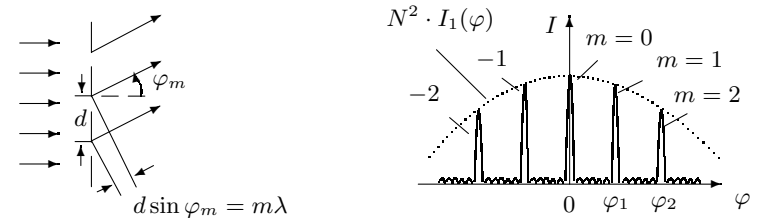


Рис. 3. Спектр амплитудной решетки.  $I_1(\varphi)$  — распределение интенсивности при дифракции света на одиночной щели,  $N$  — число щелей решетки

При дифракции Фраунгофера на одномерной решетке периода  $d$  направления  $\varphi_m$  максимальной интенсивности (главные максимумы) определяются условием:

$$d \sin \varphi_m = m\lambda, \quad (1)$$

где  $\lambda$  — длина световой волны. Главные максимумы различных порядков  $m$  имеют неодинаковые интенсивности (рис. 3). Таким образом, первичное изображение представляет собой набор ярких точек, расположенных цепочкой на равных расстояниях друг от друга. Излучение этих когерентных точечных источников создаст в плоскости  $P_2$  систему интерференционных полос, синтезирующих изображение предмета (решетки) в этой плоскости.

При таком рассмотрении дифракционные искажения, обусловленные конечным диаметром линзы, связаны с тем, что часть первичного изображения закрывается. Через микроскоп проходят только те пучки, для которых выполняется условие

$$\varphi_m < u, \quad (2)$$

где  $u$  — апертурный угол (рис. 2). Эти пучки лучей собираются в задней фокальной плоскости линзы, так что за ней возникают расходящиеся пучки лучей с центрами в плоскости  $F$ . В плоскости  $P_2$  эти пучки интерферируют и воспроизводят увеличенное изображение решетки.

Из рис. 2 ясно, что диафрагмы практически одинаковых размеров, расположенные в фокальной плоскости  $F$  или непосредственно на объ-

ективе, перекрывают те же самые пучки лучей. Таким образом, дифракцию на оправе объектива в рассмотрении Аббе можно заменить дифракцией на диафрагме  $D$ , равной по размеру диаметру работающей (открытой) части линзы и расположенной в задней фокальной плоскости  $F$ .

Рассмотрим вначале крайний случай, когда через диафрагму в плоскости  $F$  проходит только один максимум — максимум нулевого порядка. Картина в  $P_2$  изображает при этом объект, первичное изображение которого сводится к одному центральному максимуму. Но такая картина возникает лишь в том случае, когда параллельный пучок не претерпевает никакой дифракции, т. е. если решетка вообще отсутствует; в плоскости  $P_2$  получается поэтому равномерное распределение освещенности и решетка не видна.

Если приоткрыть диафрагму и поставить ее несимметрично, так, чтобы прошел только нулевой и один из первых максимумов, то на экране получится изображение, имеющее вид периодической структуры с плавным переходом от светлых мест к темным; такое изображение характерно для двухлучевой интерференции. Рассчитаем период изображения в плоскости  $P_2$  для этого случая. Линейное расстояние  $x_1$  между максимумами нулевого и первого порядка в плоскости  $F$  есть

$$x_1 \approx f\varphi_1 = f\lambda/d. \quad (3)$$

Ширина  $l$  интерференционных полос, образующихся в плоскости  $P_2$ , может быть найдена по формуле

$$l = \lambda/\omega, \quad (4)$$

где  $\omega = x_1/H$  — угол схождения интерферирующих лучей в точке наблюдения, расположенной в плоскости  $P_2$ , а  $H$  — расстояние между плоскостями  $F$  и  $P_2$ . Таким образом,

$$l \approx \lambda H/x_1 = Hd/f. \quad (5)$$

Согласно геометрической оптике изображение решетки в плоскости  $P_2$  должно иметь период

$$d' \approx \frac{H+f}{f}d. \quad (6)$$

Поскольку в случае микроскопа предмет располагается вблизи передней фокальной плоскости объектива, и, следовательно,  $H \gg f$ , получаем:  $l \approx d'$ . Таким образом, с помощью дифракционных максимумов нулевого и первого порядка в увеличенном масштабе передается основной период решетки (и не воспроизводятся никакие детали структуры, например, наличие резкой границы между светлыми и темными участками дифракционной решетки).

Если задержать каким-либо образом в плоскости  $F$  максимум первого порядка, а вместо него пропустить максимум второго порядка, то в  $P_2$  возникнет система полос с периодом в два раза меньшим, так что на экране будет видно изображение более частой решетки, чем имеющаяся в действительности. Максимумы высших порядков создают более узкие интерференционные полосы, они ответственны за передачу более тонких деталей.

Из изложенного ясно, что для получения правильного изображения надо, чтобы через объектив микроскопа проходили дифракционные пучки разных направлений. Как уже отмечалось ранее, если апертурный угол  $u$  меньше  $\varphi_1$ , то в плоскости  $P_2$  не возникает периодического изображения. Соотношение

$$\sin u \geq \lambda/d \quad (7)$$

можно рассматривать как условие разрешения решетки с периодом  $d$ . Отсюда можно найти минимальное разрешаемое объективом расстояние

$$d \geq \frac{\lambda}{\sin u} \approx \frac{\lambda}{(D/2f)}. \quad (8)$$

При этом диафрагма  $D$ , расположенная симметрично, пропускает нулевой и  $\pm 1$  максимумы.

При освещении решётки пучками, наклонными к оси, когда через диафрагму, кроме нулевого, проходит всего один из двух первых максимумов (этого достаточно для изображения периодической структуры без тонких деталей), условие разрешения принимает вид

$$d \geq \frac{\lambda}{2 \sin u}.$$

В нашей работе применяется двумерная решетка — сетка. Ее можно рассматривать как две скрещенные (перпендикулярные друг к другу) решетки. Узкий пучок монохроматического света, пройдя через решетку с вертикальными штрихами, дает совокупность максимумов, расположенных вдоль горизонтальной линии. Световой пучок, соответствующий каждому максимуму, проходя через вторую решетку, распадается на новую совокупность световых пучков, дающих максимумы вдоль вертикальной линии. Главные максимумы возникают тогда, когда одновременно выполняются условия:

$$d \sin \varphi_x = m_x \lambda, \quad d \sin \varphi_y = m_y \lambda, \quad (9)$$

где  $m_x$  и  $m_y$  — целые числа, характеризующие порядки дифракционных максимумов,  $\varphi_x$  и  $\varphi_y$  — направления на главные дифракционные максимумы в горизонтальной и вертикальной плоскостях соответственно.

Максимумы, удовлетворяющие условию  $\varphi_x, \varphi_y < u$ , создают в задней фокальной плоскости  $F$  объектива картину дифракции Фраунгофера (рис. 4) — первичное изображение.

Если теперь поместить в фокальной плоскости вертикальную щель так, чтобы через нее проходили дифракционные максимумы с  $m_x = 0$  и  $m_y = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ , то в плоскости  $P_2$  получится изображение решетки с горизонтально расположенными штрихами. Если, наоборот, пропустить максимумы с  $m_y = 0$  и  $m_x = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ , то в  $P_2$  получится изображение решетки с вертикальными штрихами. Таким образом можно продемонстрировать явление *пространственной фильтрации* — выделение различных структур в изображении.

**Экспериментальная установка.** Схема модели проекционного микроскопа приведена на рис. 5. Предметом служат сетки, расположенные в кассете. Смена сеток осуществляется поворотом внешнего кольца кассеты.

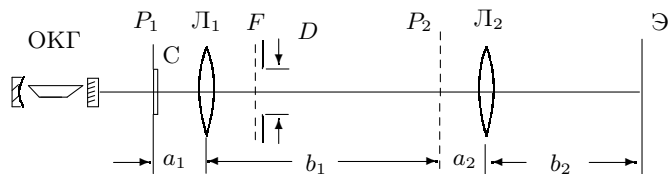


Рис. 5. Схема экспериментальной установки — модель проекционного микроскопа

Излучение лазера (ОКГ) почти перпендикулярно падает на сетку С, установленную вблизи фокальной плоскости линзы  $L_1$  — объектива микроскопа. Обычно и объектив и окуляр микроскопа — короткофокусные линзы (1–3 см). В нашей модели линза  $L_1$  выбирается достаточно длиннофокусной ( $f \approx 10$  см), т. к. размер первичного изображения в фокальной плоскости  $F$  должен быть не слишком малым, чтобы дополнительными диафрагмами можно было влиять на вторичное изображение в плоскости  $P_2$ . Вторичное изображение из плоскости  $P_2$  проецируется на экран Э линзой  $L_2$  (короткофокусной, чтобы изображение на экране было крупнее). Во избежание микротравм глаза от излучения лазера

не следует использовать эту линзу традиционным образом как окуляр микроскопа.

Изображение сетки периодически повторяется — *репродуцируется* — в пространстве между сеткой и первой линзой (см. работу 402), поэтому для того, чтобы среди множества репродуцированных изображений сетки можно было выделить её геометрическое изображение, на одну из сеток наложена тонкая проволока, т.е. непериодический объект, изображение которого не репродуцируется.

В фокальной плоскости  $F$  могут быть установлены диафрагмы — щелевая или ирисовая (отверстие с переменным диаметром) и различного рода маски (препятствия).

Как видно из соотношения (8), минимально разрешимый шаг решетки или сетки определяется апертурным углом  $u$  объектива. Обычно апертура микроскопа меняется при помощи ирисовой диафрагмы на объективе (на линзе  $L_1$  такая диафрагма есть), но в наших условиях удобнее располагать щелевую диафрагму в плоскости  $F$ . Имея набор сеток с различными периодами  $d$  и изменяя апертурный угол объектива с помощью щелевой диафрагмы, можно экспериментально проверить соотношение (8).

В нашей работе период сеток рассчитывается двумя способами: в первом способе (дифракция Фраунгофера) — расстояние между дифракционными максимумами на экране измеряется при помощи линейки, а затем по формуле решетки (1) определяется ее период; во втором способе период определяется по увеличенному с помощью модели микроскопа изображению сетки на экране.

С помощью откалиброванных таким образом сеток определяется разрешающая способность микроскопа. Для этого в задней фокальной плоскости  $F$  объектива устанавливается щелевая диафрагма с микрометрическим винтом и подбирается ее минимальный размер, при котором еще видно изображение сетки на экране (щель пропускает максимумы с  $m = 0, \pm 1$ ). По размеру диафрагмы и фокусному расстоянию объектива рассчитывается апертурный угол  $u$  и проверяется соотношение (8).

Для выполнения последней части работы ширина вспомогательной щели и угол наклона к оси системы подбираются так, чтобы на экране вместо изображения сетки получалось изображение решётки, расположенной наклонно, т. е. осуществлялась *пространственная фильтрация*. Если сетку и щель поменять местами, то соответствующим подбором сетки можно «рассечь» первичное изображение так, что изображение щели на экране будет многократно повторяться — *мультиплицироваться*.

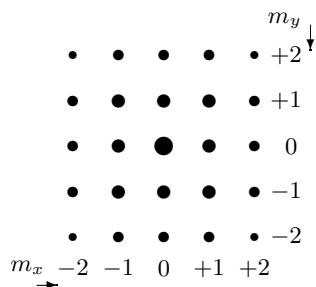


Рис. 4. Дифракция Фраунгофера на двумерной решетке (сетке). Максимумы изображены кружками, размеры которых характеризуют интенсивности

## ЗАДАНИЕ

В работе предлагается определить периоды сеток сначала по их спектру на удалённом экране, затем по увеличенному с помощью модели микроскопа изображению сеток на экране и, наконец, по результатам измерения разрешающей способности микроскопа; наблюдать явления саморепродукции, пространственной фильтрации и мультиплицирования.

### Попадание прямого луча на сетчатку опасно!

#### I. Определение периода решёток по их пространственному спектру

1. Включите в сеть блок питания лазера. Из-за переотражения в выходных стеклах лазера на его выходе может быть несколько лучей. Следите за лучом с максимальной яркостью. Яркость зелёного лазера можно ослабить с помощью светофильтра.
2. Закрепите винтом кассету с двумерными решётками (сетками) вблизи выходного окна лазера так, чтобы в окошке под отверстием с сеткой был виден номер сетки. В каждой кассете 6 различных решёток.

Вращая наружное кольцо кассеты, наблюдайте на удалённом экране дифракционные картины для разных сеток.

Для определения расстояния между соседними дифракционными максимумами измерьте расстояние между удалёнными друг от друга максимумами (горизонтальными или вертикальными) и число промежутков между ними.

Проведите измерения для шести разных сеток и укажите их номера.

3. Измерьте расстояние  $H$  от сетки до экрана<sup>1</sup>.

Запишите длину волны лазера, указанную на установке.

#### II. Определение периода решёток по изображению, увеличенному с помощью модели микроскопа

4. Соберите модель проекционного микроскопа (рис. 5). При настройке добивайтесь *центрировки* системы: световой пучок, прошедший одну линзу, и пучок, прошедший обе линзы, должны попадать в то же место экрана, куда падал луч от лазера в отсутствие линз (это место на экране можно заранее отметить, при необходимости бумагу на экране легко заменить).

Длиннофокусная линза  $L_1$  ( $f \approx 10$  см) — должна отстоять от сетки на расстоянии чуть большем фокусного, при этом изображение сетки в плоскости  $P_2$  получится на расстоянии, в несколько раз превышающем фокусное. Найдите это изображение на листе бумаги, затем с помощью короткофокусной линзы  $L_2$  получите резкое изображение сетки на экране.

<sup>1</sup>Метки на столах расположены на расстояниях 50, 100 и 120 см от экрана.

Для того чтобы выделить изображение сетки, соответствующее законам геометрической оптики (для устранения влияния саморепродукции), найдите резкое изображение проволоочки, расположенной на одной из сеток, и убедитесь, что при смене сеток резкость изображений на экране не нарушается. При тонкой настройке следует иметь в виду, что система критична к небольшому движению объектива вдоль оси системы, а движение окуляра слабо влияет на резкость изображения.

5. Определите расстояния  $a_1, b_1, a_2, b_2$  (рис. 4), учитывая следующие факторы: положение центров линз указаны на оправках проточками; расстояние  $a_2 \simeq f_2$ , поэтому положение промежуточного изображения можно не искать, а измерять сразу  $(b_1 + a_2)$  — «длину тубуса» микроскопа.

Так как для одной линзы увеличение равно  $b/a$ , то для всей системы оно составляет  $b_1 b_2 / (a_1 a_2)$ .

Измерьте периоды изображений сеток на экране.

#### III. Определение периода решёток по оценке разрешающей способности микроскопа

6. Поместите целевую диафрагму с микрометрическим винтом в фокальную плоскость  $F$  линзы  $L_1$ . Определите для каждой решётки минимальный размер диафрагмы  $D$ , при котором на экране ещё видно изображение сетки (при меньших размерах щели изображение выглядит как одномерная решётка).

#### IV. Пространственная фильтрация и мультиплицирование

7. Проведите качественный опыт по пространственной фильтрации. Подберите сетку средних размеров с достаточно крупным вторичным изображением. Ширину щели подберите так, чтобы она свободно пропускала максимум нулевого порядка и не пропускала максимумы первого порядка, расположенные в поперечном направлении. Поворачивая щель относительно оси системы, получите изображения решёток при различных ориентациях щели: для вертикального положения щели, когда она пропускает только дифракционные максимумы  $(0, m_x)$ , для горизонтального положения, когда проходят только дифракционные максимумы  $(m_y, 0)$ , и для наклонного положения под углом  $45^\circ$ , когда пропускаются максимумы с  $m_x = m_y$ . В этом случае на экране видна наклонная решётка — периодическая структура, которой нет в исходном объекте. Объясните наблюдаемые явления.
8. Для наблюдения явления мультиплицирования поменяйте местами сетку и щель: сначала, не трогая линз, получите на экране резкое изображение щели, а затем в фокальной плоскости  $F$  объектива поставьте кассету с сетками, которые будут «рассекать» фурье-образ щели.

Подберите такую ширину входной щели  $D$ , чтобы на экране можно было наблюдать мультиплицированное изображение для всех сеток. Чем уже щель, тем шире её фурье-образ и тем легче «рассечь» его сетками.

Проследите, как влияет на изображение уменьшение ширины щели при неизменной сетке, и что происходит при смене сеток при постоянной ширине щели. Объясните явления.

#### V. Обработка результатов

1. По измерениям спектров определите дифракционные углы ( $\varphi \simeq \sin \varphi$ ) и по формуле (1) рассчитайте периоды решеток.
2. По измерениям увеличенных с помощью микроскопа изображений сеток рассчитайте их периоды и сравните с результатами, полученными по дифракционной картине.
3. По измерениям со щелью рассчитайте по формуле (8) минимальное расстояние (период решётки  $d$ ), разрешаемое микроскопом, и сравните с результатами предыдущих измерений.
4. Для проверки теории Аббе постройте график зависимости  $d = f(1/D)$ , взяв периоды сеток, определённые по спектру. Проверьте справедливость формулы (8).

#### Контрольные вопросы

1. Какому условию должно удовлетворять расстояние между сеткой и экраном, чтобы на экране наблюдалась дифракционная картина Фраунгофера?
2. Почему при наблюдении дифракции на удалённом экране дифракционные максимумы в случае крупных сеток перекрываются?
3. Почему предмет располагается вблизи передней фокальной плоскости объектива микроскопа?
4. Почему при смещении сетки в поперечном направлении первичное изображение не меняется, а вторичное смещается?
- 5\* Какой пространственный фильтр следует расположить в задней фокальной плоскости объектива, чтобы получить в плоскости  $P_2$  изображение сетки с уменьшенными в два раза линейными размерами ячеек?

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ландсберг Г.С. Оптика. — М.: Наука, 1976. Гл. XIV, § 92; гл. XV, §§ 96, 97.
2. Сивухин Д.В. Общий курс физики. Т. IV. Оптика. — М.: Наука, 1980. Гл. IV, §§ 56, 57.
3. Кингсеп А.С., Локшин Г.Р., Ольхов О.А. Основы Физики. — Т. I. Механика, электричество и магнетизм, колебания и волны, волновая оптика. — М.: Физматлит, 2001. Ч. 3, гл. 8, § 8.10.
- 4\* Дитчберн Р. Физическая оптика. — М.: Наука, 1965. Гл. 8, §§ 8.19–8.29.