

第四节、相衬显微镜

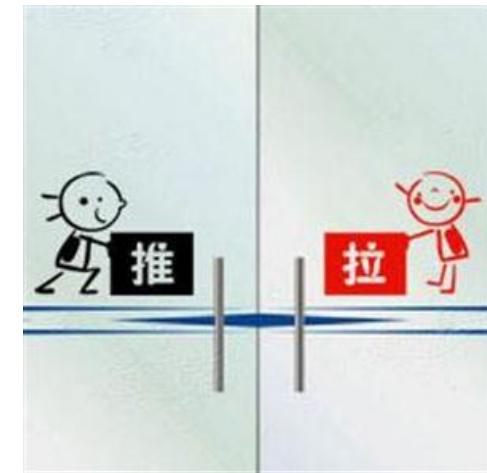
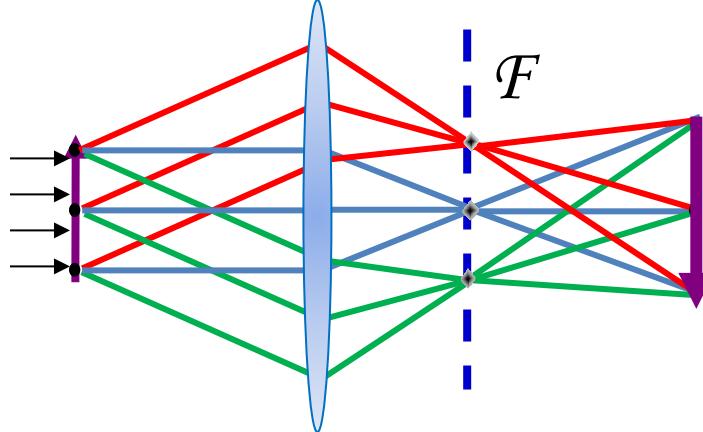
对于完全透明的标本，因为其各个部分对于光波的吸收基本一致，普通显微镜无法看到。

但是，这并不是说光波在经过透明标本的不同部分时不受影响或受到的影响都一样。

事实上，由于不同部分的折射率不同，虽然光通过后成像的振幅基本一致，但光波在通过时的光程是不一样的。

怎么观察透明标本？

举例：



样品为相位型， $\tilde{t}(x, y) = e^{i\phi(x, y)}$

物场 $\tilde{U}_o(x, y) = A_1 e^{i\phi(x, y)} \xrightarrow{\text{傅里叶变换}} F(f_x, f_y)$

$\xrightarrow{\text{傅里叶变换}}$ 像场 $\tilde{U}_I(x', y') \propto \tilde{U}_o(x', y') = A_1 e^{i\phi(x', y')}$

像场光强分布：

$$I(x', y') = \tilde{U}_I(x', y') \tilde{U}_I^*(x', y') \propto A_1^2 \quad \text{均匀照明}$$

人眼对振幅的差别可以看出来，但对相位的差别是不能察觉的。

怎么观察透明标本？

细胞染色

- *简单染色法
- *革兰氏染色法
- *荚膜染色
- *负染色法
- *抗酸性染色法
- *芽胞染色法
- *荧光法

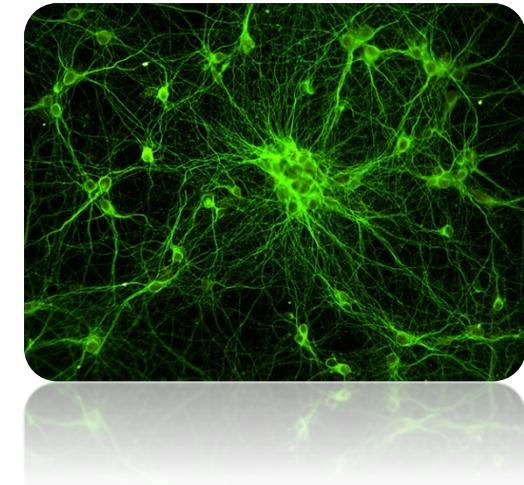
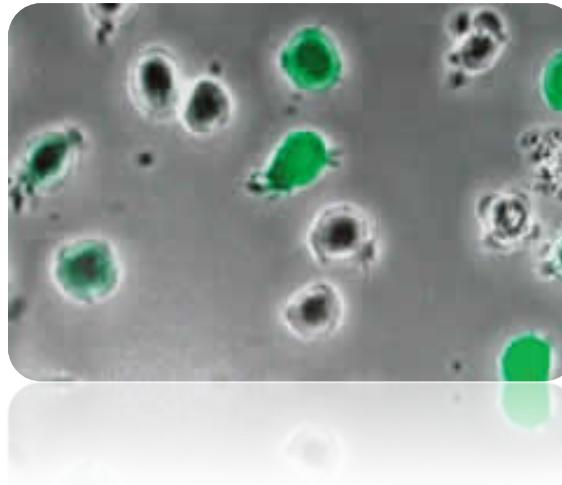
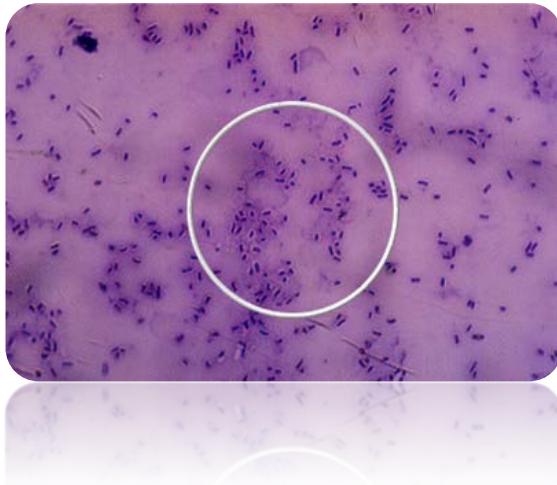
染色的一般方法：

将样品制备在玻片上，染色前玻片先经过热固定。

将玻片置于染色盘上，覆以染色液。

经适宜的时间后，以蒸馏水尖嘴瓶小心冲去过剩染色液。

此时玻片应与水流平行，减少微生物自抹片中的流失。以吸水纸吸干抹片，切勿揩拭。



标本经过染色固定后，各个部分对光波的吸收程度不一样，所以用显微镜观察标本时，我们能够看到颜色和亮度不同的图象。

物理方法：

泽尼克提出了相衬法，根据相衬原理制备了相衬显微镜（Phase contrast microscope），又叫相差显微镜。

相衬法把样品的相位信息通过一种特殊的滤波器，转化为输出像面上的光强分布，为分析相位型样品提供了一种有效手段。

泽尼克发明的相衬法和相衬显微镜是光学空间滤波和信息处理技术应用的一项首创性工作。

相衬显微镜的主要特点是不需要对标本进行染色，这就避免了在染色过程中由于化学作用可能引起的标本内部结构的变化。有些染不上色的标本也可以用相衬显微镜来观察。各种显微镜都可以通过增加相衬装置来观看相差。**无需标记（Label-free）**

相衬原理

$$\tilde{U}_O(x) = A e^{i\phi(x)} \quad \text{Fourier transform}$$

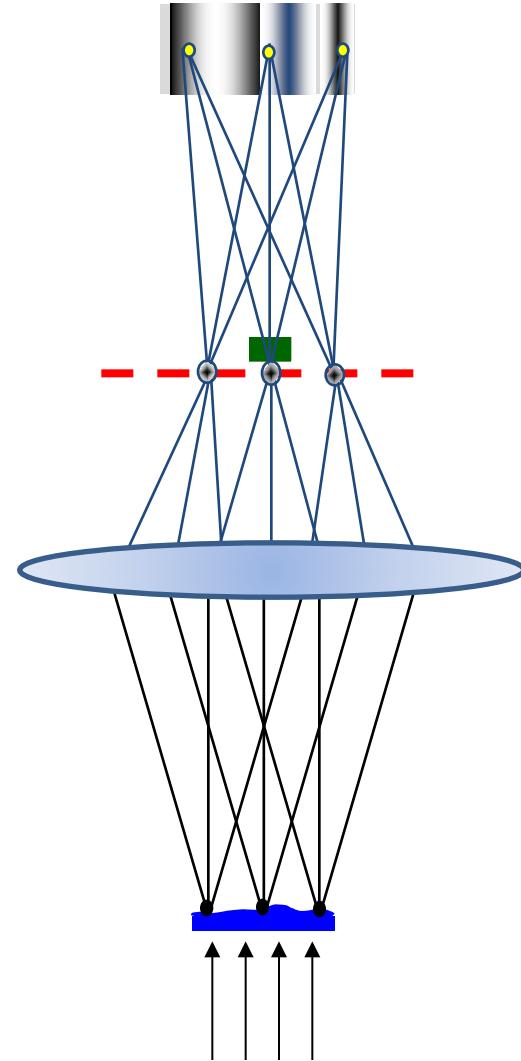
$$= \frac{a_0}{2} + \sum_{k=1}^{\infty} (a_k \cos 2\pi f_k x + b_k \sin 2\pi f_k x)$$

$$= c_0 + \sum_{k=-\infty, k \neq 0}^{\infty} c_k \exp(i2\pi f_k x)$$

If: 在零级谱斑上放一个相位板，
使零级谱斑相移 $e^{i\delta}$, 透过率为 τ

Then: 反逆到物平面上, 等效于:

$$c_0 \xrightarrow{\tau e^{i\delta}} c_0 \tau e^{i\delta}$$



Rewritten as

$$\tilde{U}_o(x) = Ae^{i\phi(x)} = c_0 + \sum_{k=-\infty, k \neq 0}^{\infty} c_k \exp(i2\pi f_k x)$$

$$c_0 \xrightarrow{\tau e^{i\delta}} c_0 \tau e^{i\delta}$$

新的等效物场：

$$\begin{aligned}\tilde{U}'_o(x) &= c_0 \tau e^{i\delta} + \sum_{k=-\infty, k \neq 0}^{\infty} c_k \exp(i2\pi f_k x) \\ &= c_0 (\tau e^{i\delta} - 1) + \tilde{U}_o(x)\end{aligned}$$

对应的新的像场：

$$\tilde{U}'_I(x') \propto \tilde{U}'_o(x') = c_0 (\tau e^{i\delta} - 1) + \tilde{U}_o(x') = c_0 (\tau e^{i\delta} - 1) + Ae^{i\phi(x')}$$

Rewritten as

$$\tilde{U}_I'(x') \propto c_0(\tau e^{i\delta} - 1) + A e^{i\phi(x')}$$

像场光强分布： $I_I'(x') = (\tilde{U}_I'(x'))(\tilde{U}_I'(x'))^*$

$$\propto (c_0^2 + A^2 + c_0^2\tau^2 - 2c_0^2\tau \cos \delta) + 2c_0\tau A(\sin \delta \sin \phi(x') + \cos \delta \cos \phi(x')) - 2c_0A \cos \phi(x')$$

⇒ 像面上光强的分布和样品的相位信息相关联。

- 弱相位物体， $\phi(x') \ll 1, c_0 \approx A$

$$I \propto ((c_0 - A)^2 + c_0^2\tau^2 - 2c_0^2\tau \cos \delta + 2c_0\tau A \cos \delta) + 2c_0\tau A \phi(x') \sin \delta$$

$$I \propto c_0^2\tau^2 + 2c_0^2\tau \phi(x') \sin \delta \propto \tau + 2\phi(x') \sin \delta$$

$\delta \approx \pi/2, I_I \propto \tau + 2\phi(x')$ 减小 τ , 有利于提高衬比度

$$\propto \left(c_0^2 + A^2 + c_0^2 \tau^2 - 2c_0^2 \tau \cos \delta \right) + 2c_0 \tau A (\sin \delta \sin \phi(x') + \cos \delta \cos \phi(x')) - 2c_0 A \cos \phi(x')$$

暗场法 --- 提高相衬的有效方法。其办法是在傅氏面上把0极斑完全遮掉。

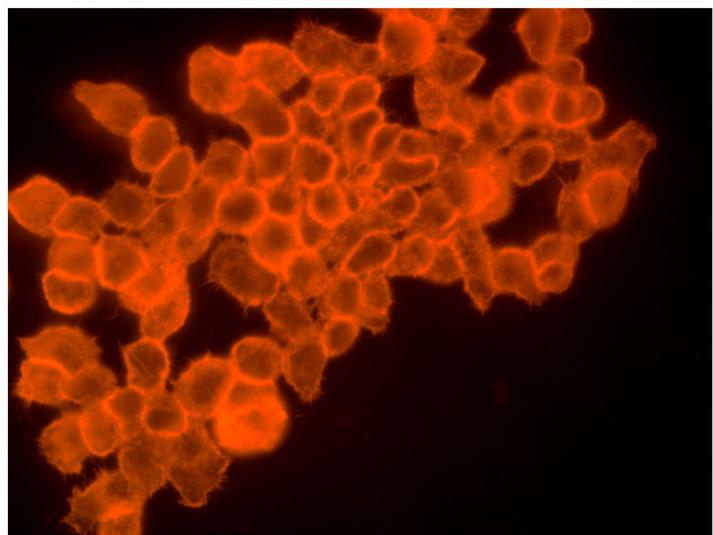
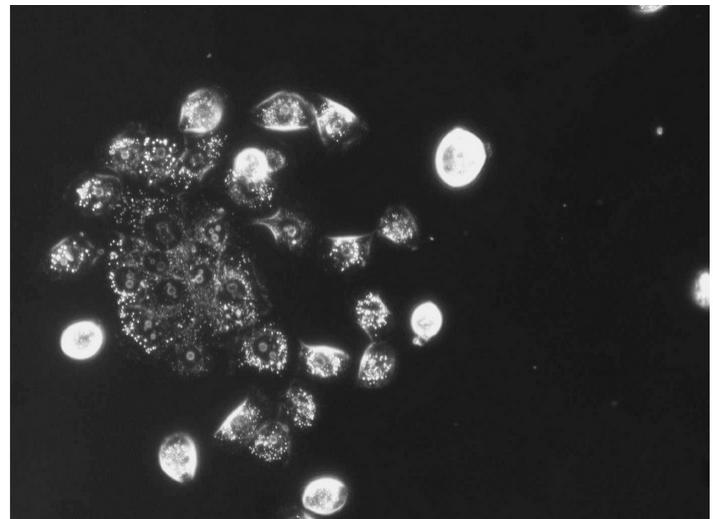
$$\tau = 0$$

$$\propto \left(c_0^2 + A^2 \right) - 2c_0 A \cos \phi(x')$$

$$c_0 \approx A$$

$$\propto 2A^2 (1 - \cos \phi(x'))$$

$$\propto A^2 \phi^2(x')$$



BxPC-3/hK7 clone#7

Expression of hK7 in BxPC-3 cells results in an altered cell morphology.
Phase-contrast (upper) or rhodamine phalloidin-stained (lower) images of
hK7-expressing clones BxPC-3/hK7 clone#7.

泽尼克(Frits Zernike, 1888-1966)

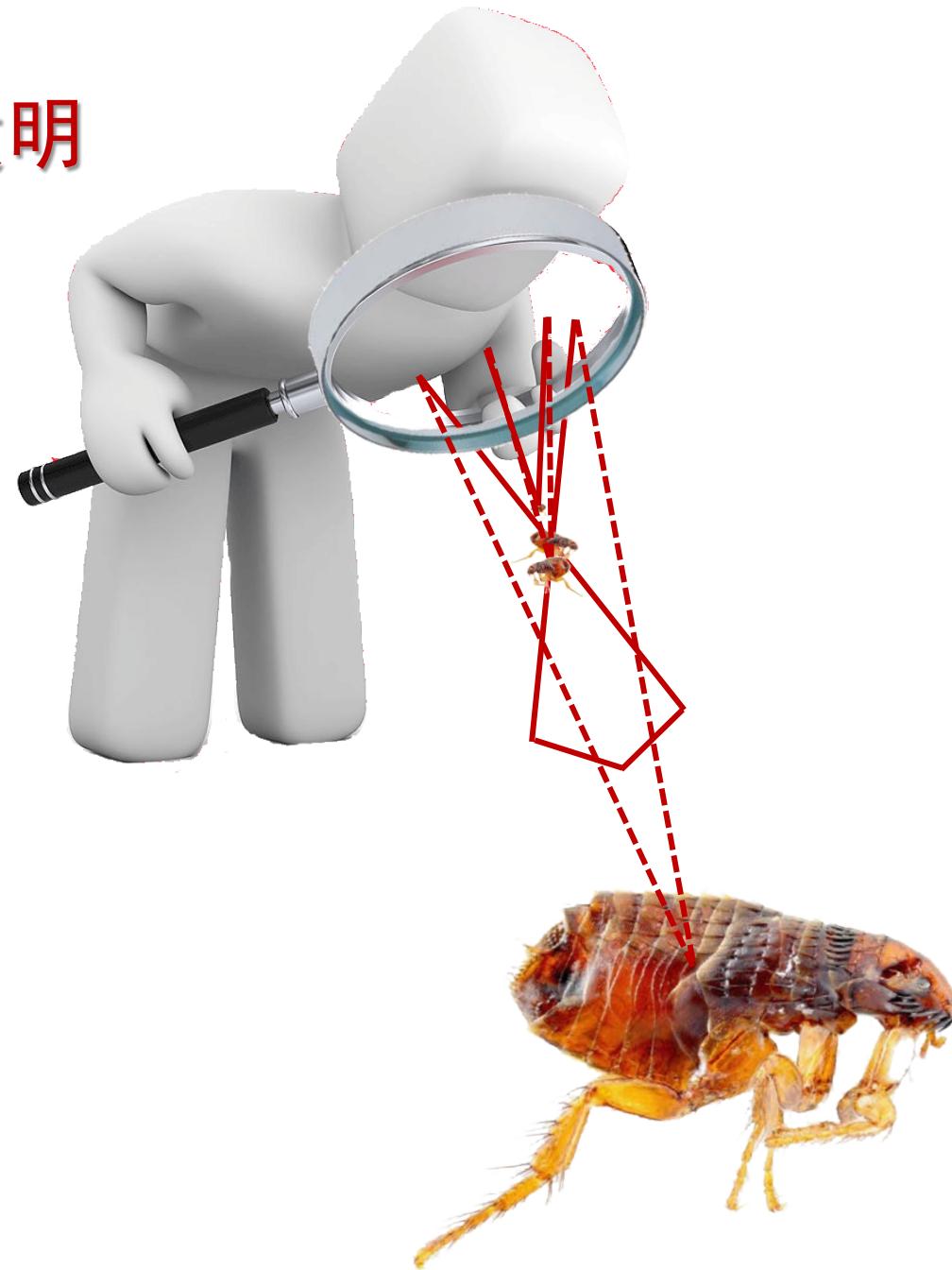


1953年获若贝尔物理奖

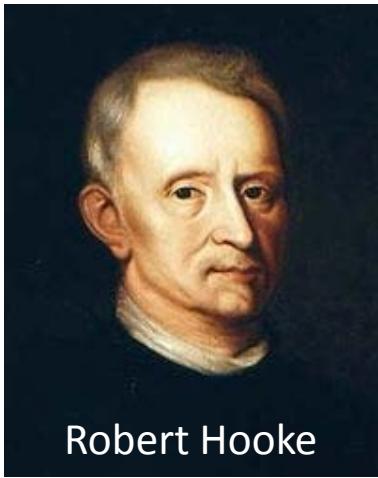
On looking back to this event, I am impressed by the great limitations of the human mind. How quick are we to learn, that is, to imitate what others have done or thought before. And how slow to understand, that is, to see deeper connections,. Slowest of all, however, are we in inventing new connections or even in applying old ideas in a new field.

一、眼见为实 —— 显微镜发明

早在公元前一世纪，人们就已发现通过球形透明物体去观察微小物体时，可以使其放大成像。后来逐渐对球形玻璃表面能使物体放大成像的规律有了认识。

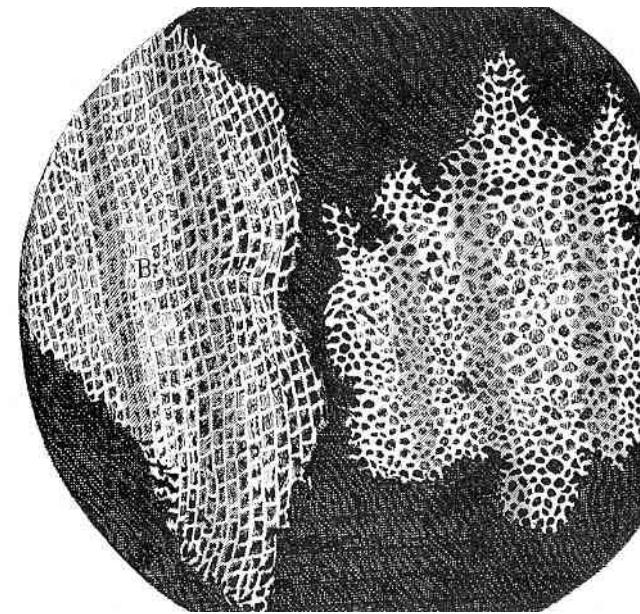


400年前，显微镜发明



Robert Hooke

第一次打开了人类认识微观世界的大门
开启了人类生命与生活的重要内容



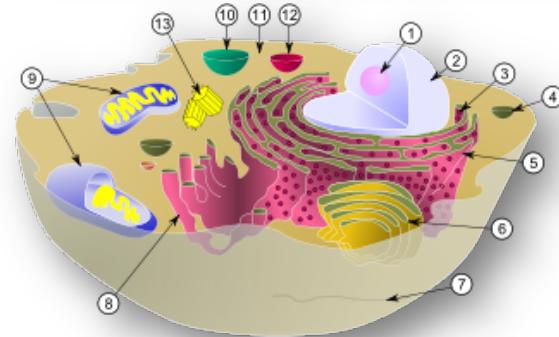
软木的木栓组织
上的微小气孔

- 1665年，Robert Hooke(胡克)：「细胞」名词便是由虎克利用显微镜观察软木的木栓组织上的微小气孔而得来的。

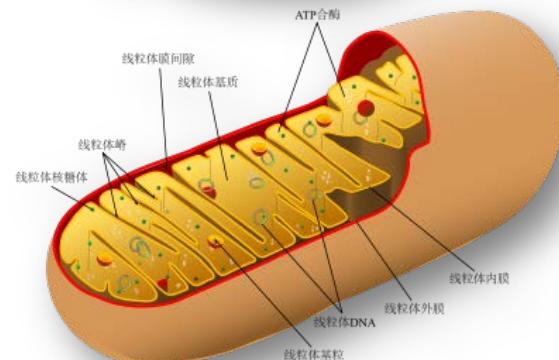


- 1674年，Leeuwenhoek(列文虎克)：发现了原生动物，并随后首次发现「细菌」。

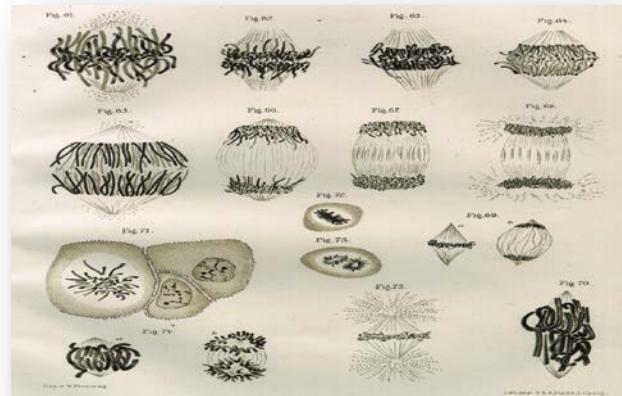
- 1833年，Brown(布朗)：在显微镜下观察紫罗兰，随后发表了对「细胞核」的详细论述。



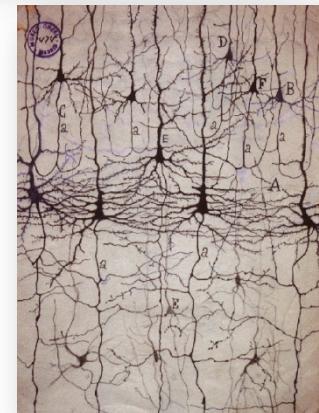
- 1857年，Kolliker(寇利克)：发现细胞中之「线粒体」。



- 1879年，Flemming(佛莱明)：发现了动物细胞进行**有丝分裂**时，其清晰可见的染色体活动过程。



- 1888年，Cajal (卡嘉尔)为首的组织学家发展出**显微镜染色观察法**，为显微解剖学奠定了基础。



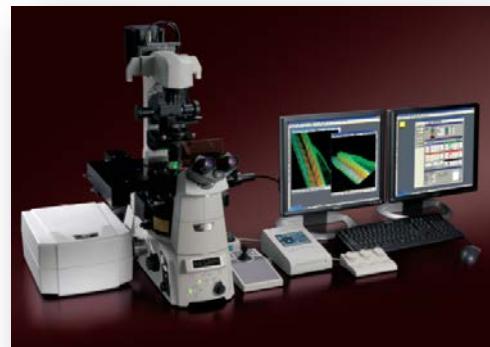
- 1930年，Lebedeff(莱比戴卫)：搭建第一架干涉显微镜，同时Zernike(卓尼克)在1932年发明出相位差显微镜，适用于观察**活细胞**和**未染色标本**。



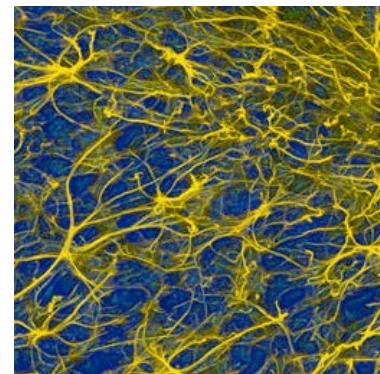
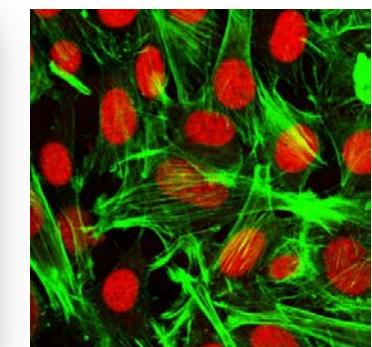
- 1952年，Nomarski (诺马斯基)：发明微分干涉相位差光学系统。适用于观察**活细胞**的种种细节。



- 1988年，Confocal 扫描显微镜被广为使用。既可以用于观察**细胞形态**，也可以用于进行细胞内**生化成分的定量分析**、和实现**长时间活细胞动态观察**。



- 1990年，发展了非线性光学多光子显微成像技术。适用于**生物细胞**、**活组织**的长时间**动态三维成像**。



利用显微镜

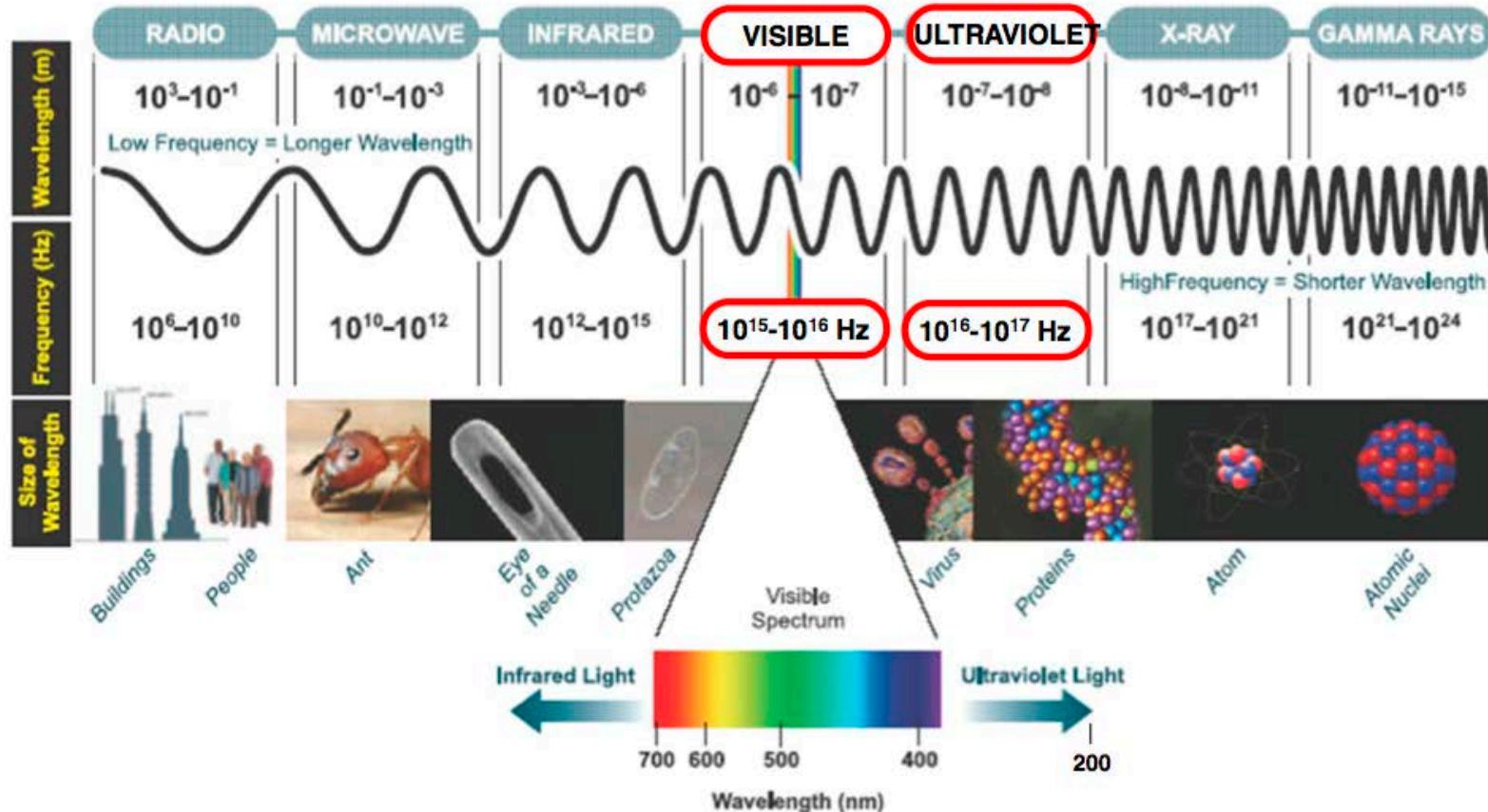
人类通过眼睛来观察世界，从而能动地改造世界。

↑
可见光

新波段的成像

光的本性

光波 —— 电磁波 波长（频率）
眼睛可感受到的光波波长范围——可见光



不同的波长尺度对应着不同的生物特征尺寸

短波区域：X光的发现

波长 0.01~10 nm



伦琴

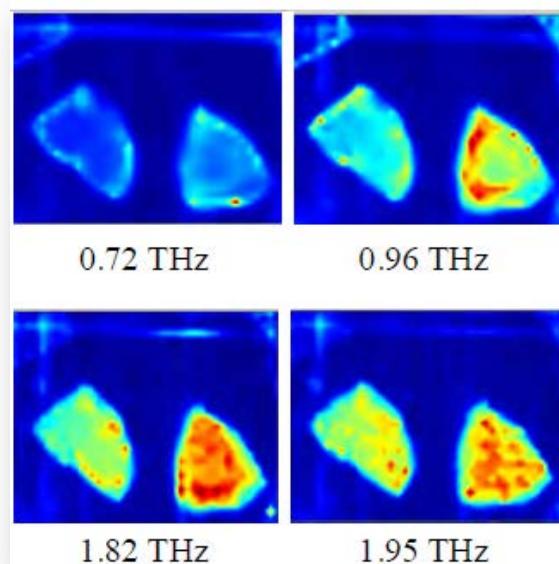
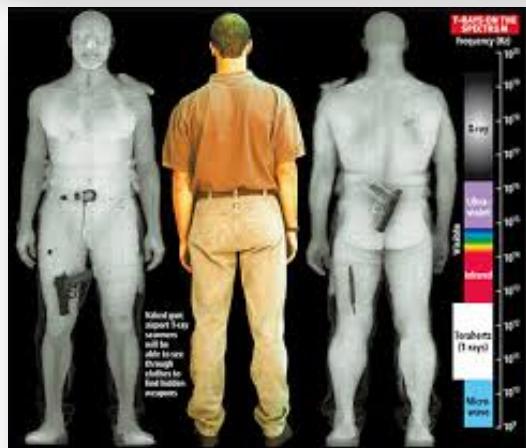
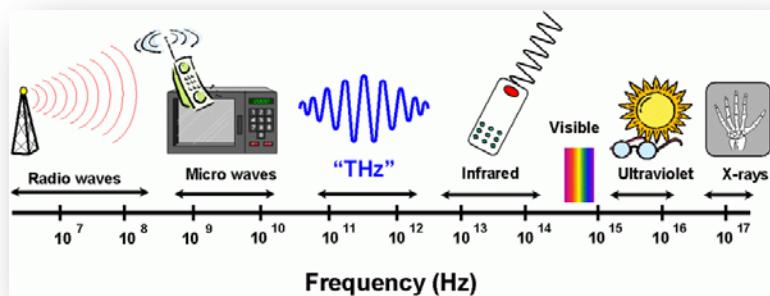


伦琴妻子的手

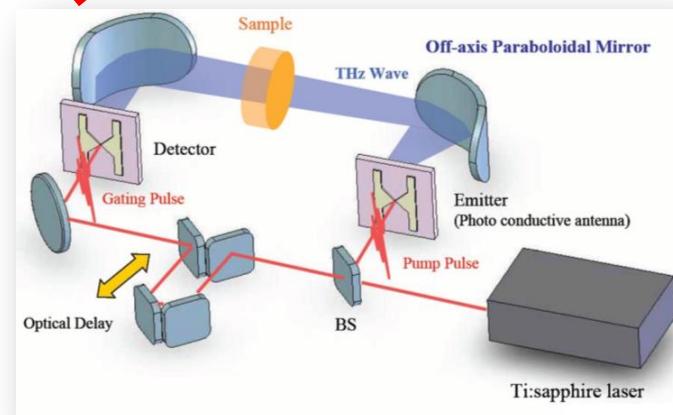
研究阴极射线时发现X射线。1901年，获得首届诺贝尔物理学奖



长波区域：THz 生物医学成像 $\lambda: 0.03 - 3\text{mm}$



癌症肝脏THz吸收图像



太赫兹波是指频率在 0.1THz 到 10THz 范围的电磁波，介于微波与红外之间。太赫兹波具有**很强的穿透能力**，与X光相比对生物样品组织**辐射损伤小**，在生物医学成像领域有广泛的应用。例如皮肤癌、乳腺癌以及肝癌的检测。右边所示为患癌肝脏在特定太赫兹波谱的成像结果。



射频波段

核磁共振谱学及成像 —— 波谱学技术的代表之一



Isidor Isaac Rabi

气态原子磁共振
1944年诺贝尔物理学奖



Felix Bloch

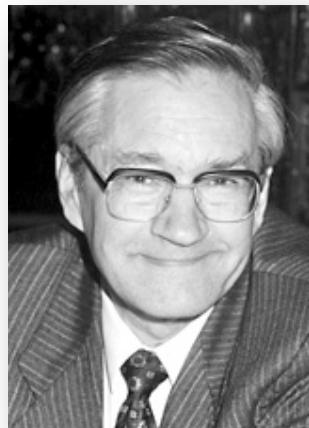
宏观核磁共振 - 1952年诺贝尔物理学奖



Edward Mills Purcell



F.6 BSF



Richard R. Ernst

高分辨NMR
1991年诺贝尔化学奖



Kurt Wüthrich

NMR蛋白结构解析
2002年诺贝尔化学奖



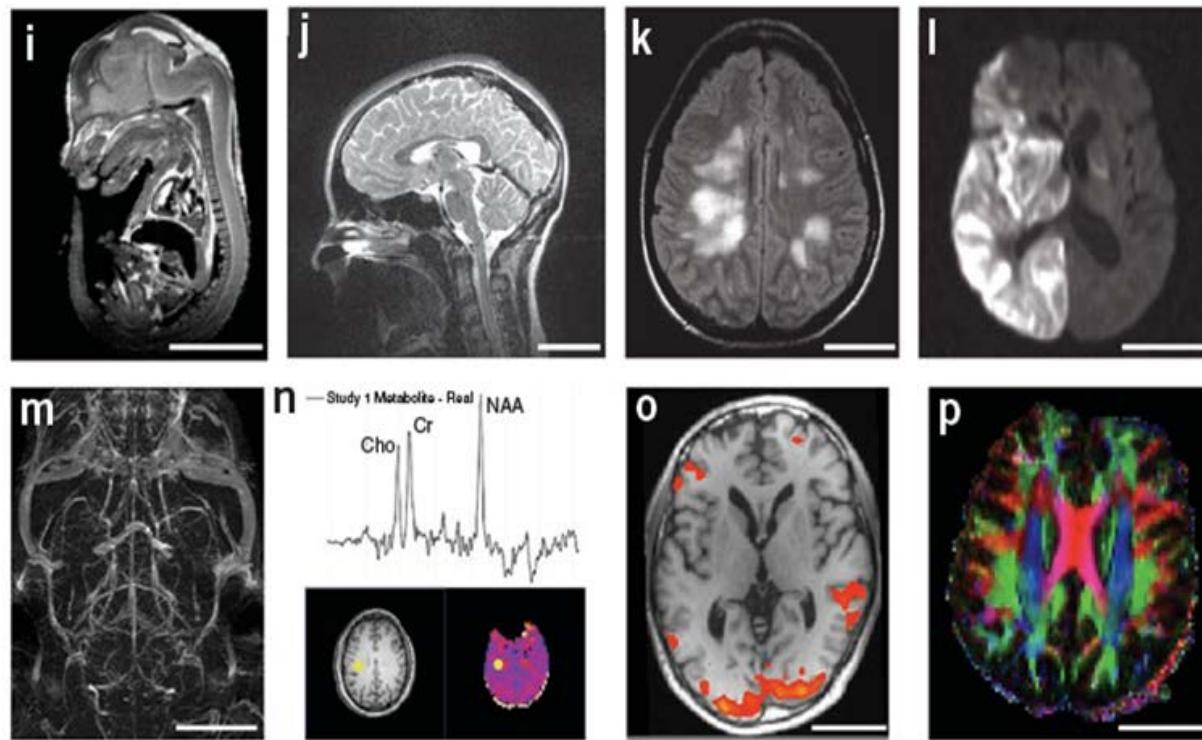
Paul C. Lauterbur

MRI - 2003年诺贝尔医学及生理学奖



Sir Peter Mansfield

NMR成像技术的发展，促进了生命科学与医学的进步



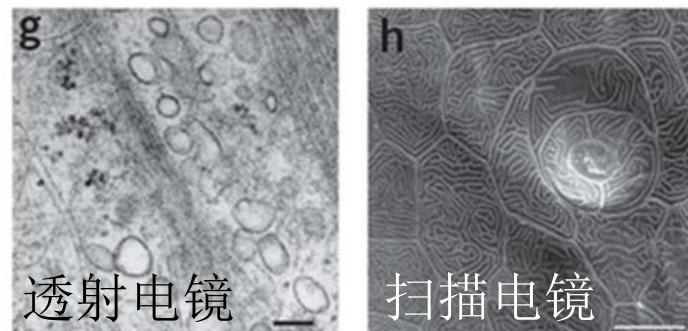
各种磁共振成像

“电子束”代替“光束”

—— 电子显微镜

1931年，恩斯特·鲁斯卡通过研制电子显微镜，电子束和电子透镜代替光束和光学透镜，使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。使生物学发生了一场革命。这使得科学家能观察到百万分之一毫米那样小的物体。

1986年恩斯特·鲁斯卡被授予诺贝尔奖。



透射电镜

激光新技术

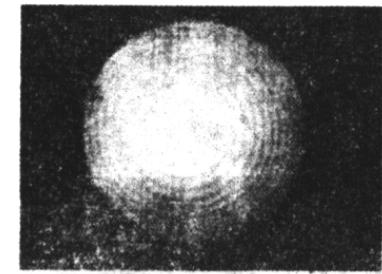
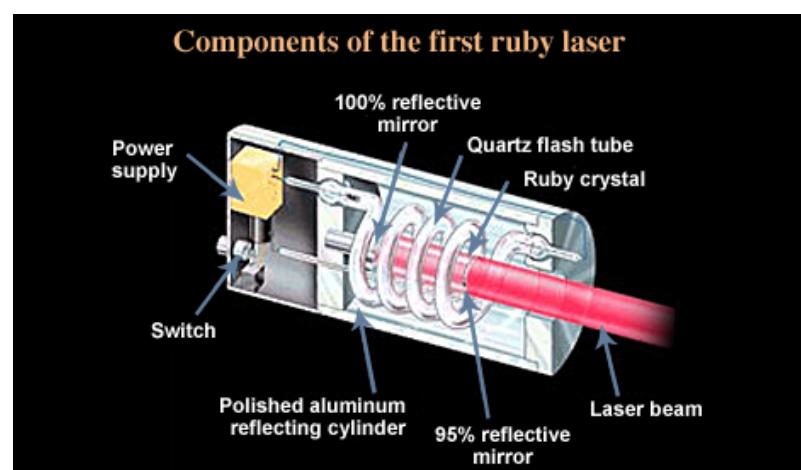
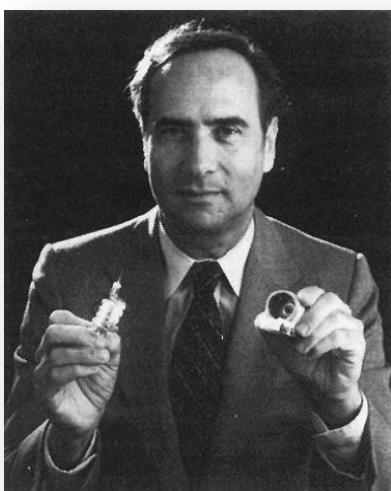
激光是20世纪，继原子能、计算机、半导体之后，人类的又一重大发明，被称为“最快的刀”、“最准的尺”、“最亮的光”。它的亮度约为太阳光的100亿倍。

激光的诞生…

LASER-- Light Amplification for Stimulated Emission of Radiation
受激发射的光放大产生的辐射

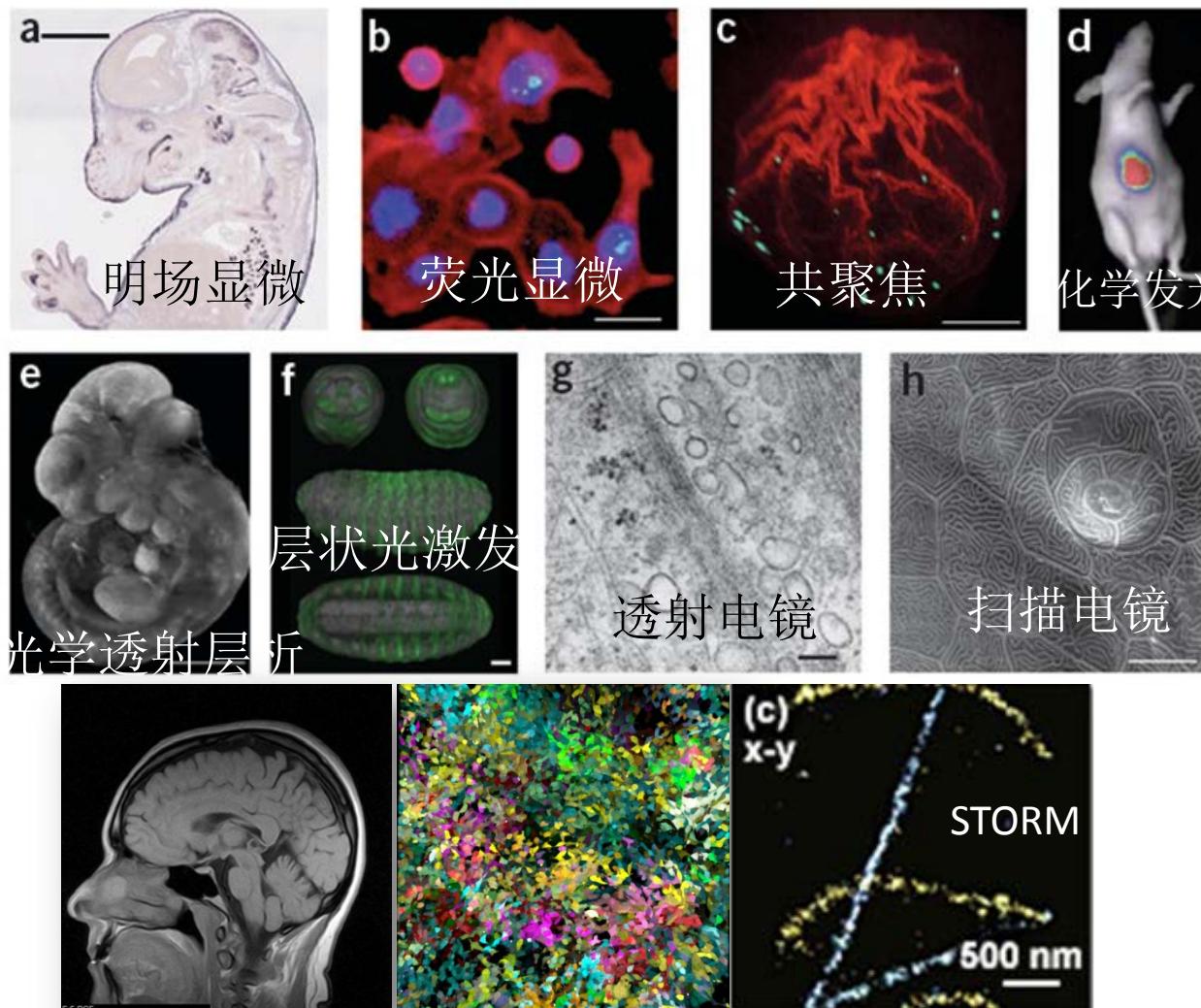
理论基础 1958年 Townes、Schawlow 提出
(汤斯，巴索夫，普罗霍罗夫 64年 Nobel 奖)
(肖洛，布洛姆伯根，西格巴恩 81年 Nobel 奖)

第一台激光器 红宝石激光
1960年 Maimain 发明



694.3nm

当代成像方法的发展，极大地促进了生命科学与医学的进步

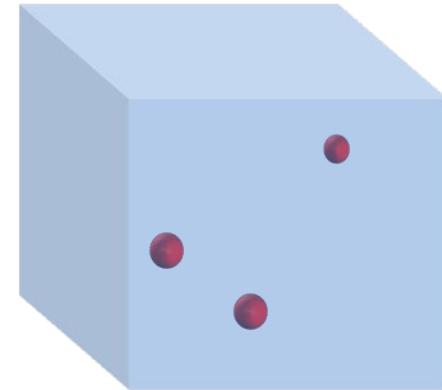
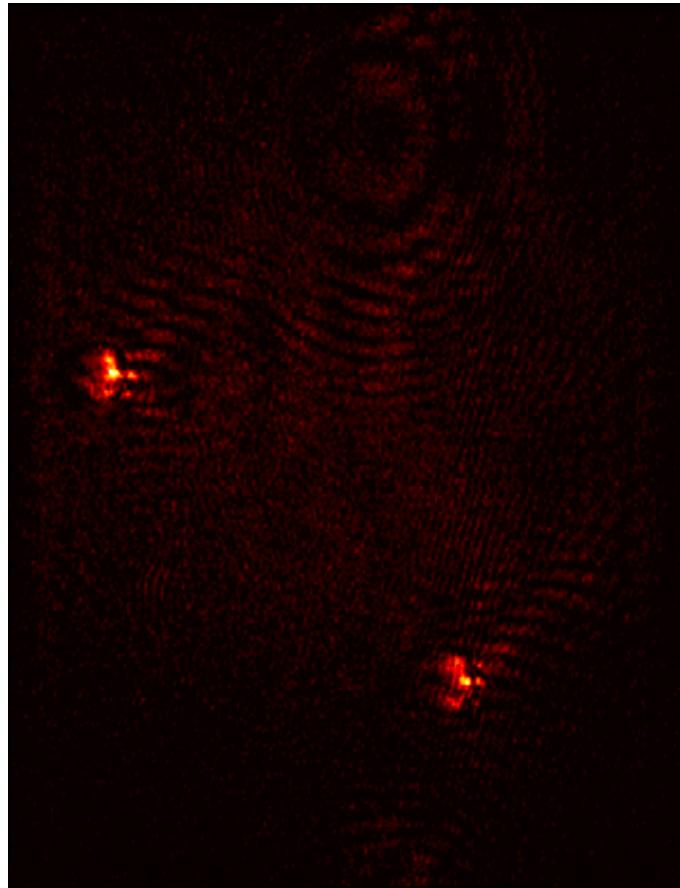


核磁共振

激光荧光蛋白成像

(2008诺贝尔化学奖)

新成像技术发展：脉冲激光实现三维相干拉曼显微成像



说明：自由悬浮的高分子微球（ $10\mu\text{m}$ ）瞬态分布的拉曼显微三维成像

第五节：全息学原理

余弦型环状波带片的衍射

余弦型环状波带片的制备：

平面光和球面光干涉， why?

$$\tilde{U}_1(x, y) = A_1 e^{i\phi_0},$$

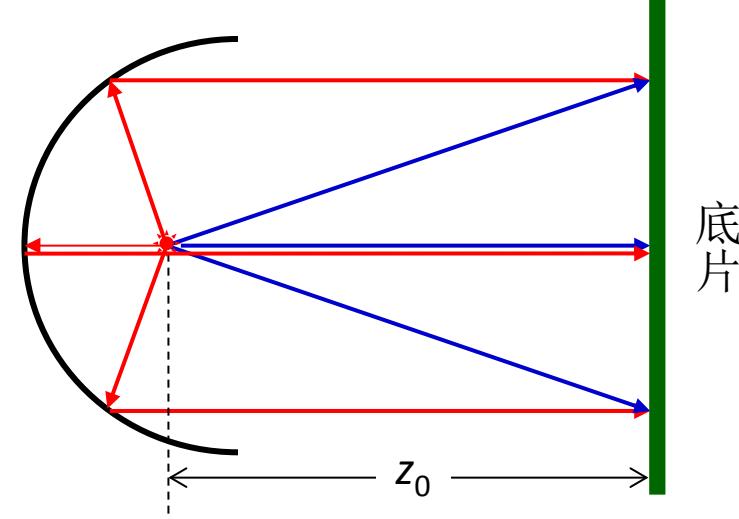
$$\tilde{U}_2(x, y) = A_2 e^{ik(x^2 + y^2)/2z_0}$$

$$\begin{aligned}\Rightarrow I(x, y) &= (\tilde{U}_1(x, y) + \tilde{U}_2(x, y)) \cdot (\tilde{U}_1(x, y) + \tilde{U}_2(x, y))^* \\ &= A_1^2 + A_2^2 + 2A_1 A_2 \cos\left(k \frac{x^2 + y^2}{2z_0} - \phi_0\right)\end{aligned}$$

用干板记录，通过显影和定影，干板底片的透过率函数为：

$$t(x, y) = \alpha + \beta I(x, y) = t_0 + t_1 \cos\left(k \frac{x^2 + y^2}{2z_0} - \phi_0\right)$$

振幅型



平面波正入射，其入射波前为： $\tilde{U}_1(x, y) = A_1$

如果入射光和记录光的波长相同，则 $k_1 = k_2 = k$ 。

经过环状余弦波带片后，透射波前为：

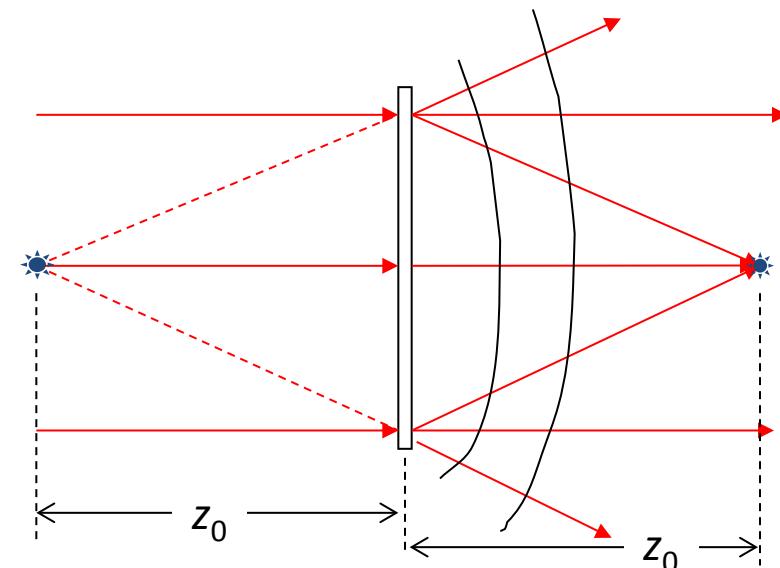
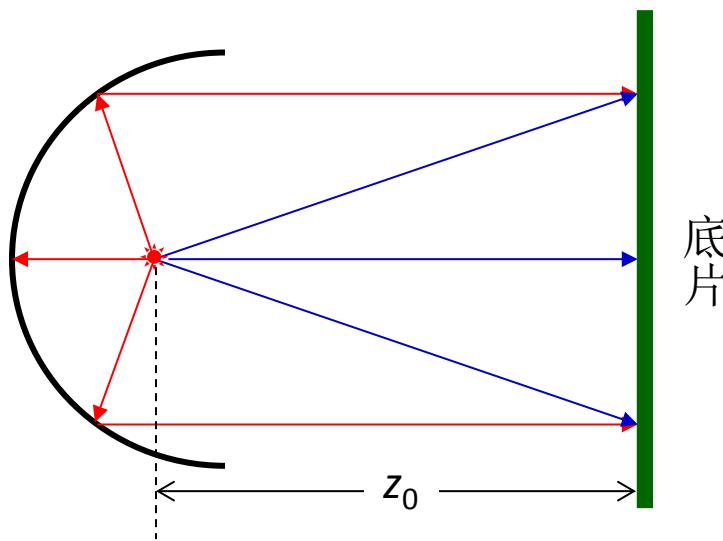
$$\tilde{U}_2(x, y) = \tilde{t}(x, y)\tilde{U}_1(x, y) = A_1 \left[t_0 + t_1 \cos\left(k \frac{x^2 + y^2}{2z_0}\right) \right]$$

$$= A_1 t_0 + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{ik \frac{x^2 + y^2}{2z_0}} + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{-ik \frac{x^2 + y^2}{2z_0}}$$
$$= \tilde{U}_0 + \tilde{U}_{+1} + \tilde{U}_{-1}$$

0级为正出射的平面波

+1级 \tilde{U}_{+1} 代表发散球面波，发散点为 $(0, 0, -z_0)$

-1级 \tilde{U}_{-1} 代表汇聚球面波，汇聚点为 $(0, 0, z_0)$



余弦型环状波带片的制备和衍射场

$$\tilde{U}_2(x, y) = A_1 t_0 + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{ik \frac{x^2 + y^2}{2z_0}} + \frac{1}{2} A_1 t_1 e^{-ik \frac{x^2 + y^2}{2z_0}} = \tilde{U}_0 + \tilde{U}_{+1} + \tilde{U}_{-1}$$

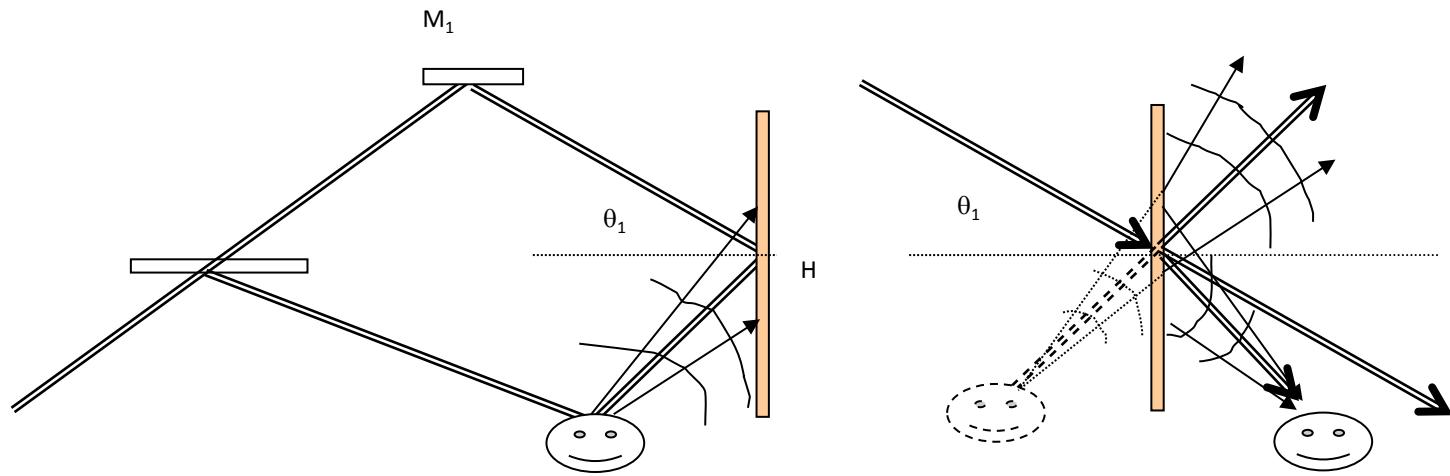
0级为正出射的平面波

+1级 \tilde{U}_{+1} 代表发散球面波，发散点为 $(0, 0, -z_0)$

-1级 \tilde{U}_{-1} 代表汇聚球面波，汇聚点为 $(0, 0, z_0)$

思考：

如果是一个点光源的集合，即是一个物体，衍射光如何？

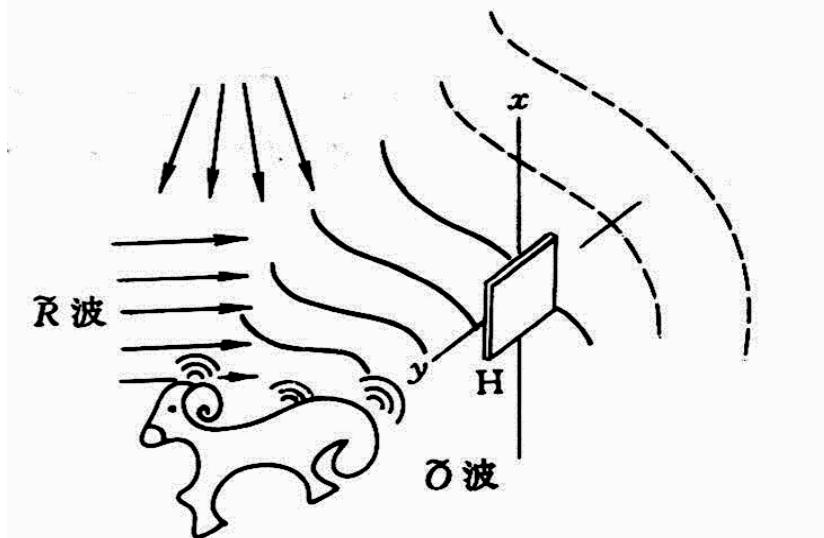


物光可以看成大量点光源的集合。

全息理论

干涉记录 + 衍射再现

◆ 物光波前的全息记录——双光场干涉



物光波 O ,
参考光波 R

图 7.2 物光波前的全息记录

干涉场: $\tilde{U}_H(x, y) = \tilde{O}(x, y) + \tilde{R}(x, y)$

干涉光强分布:

$$\begin{aligned} I_H(x, y) &= \tilde{U}_H \cdot \tilde{U}_H^* = (\tilde{O} + \tilde{R}) \cdot (\tilde{O}^* + \tilde{R}^*) \\ &= |\tilde{O}|^2 + |\tilde{R}|^2 + \tilde{R}^* \cdot \tilde{O} + \tilde{R} \cdot \tilde{O}^* \end{aligned}$$

物波 O 是物体上各点源发射的大量次波源的相干叠加，可以表示为：

$$\tilde{O}(x, y) = \sum_i \tilde{u}_i(x, y) = A_o(x, y) e^{i\phi_o(x, y)}$$

参考光波：

$$\tilde{R}(x, y) = A_R(x, y) e^{i\phi_R(x, y)}$$

干涉强度：

$$I_H(x, y) = A_O^2(x, y) + A_R^2(x, y) + A_R e^{-i\varphi_R} \cdot \tilde{O} + A_R e^{i\varphi_R} \cdot \tilde{O}^*$$

I_H 的记录和存储:

显影和定影，底片的透过率 t_H 和相干强度成线性关系：

$$\tilde{t}_H(x, y) = t_0 + \beta I_H(x, y)$$

$$= t_0 + \beta [A_O^2(x, y) + A_R^2(x, y)] + \beta A_R e^{-i\phi_R} \cdot \tilde{O} + \beta A_R e^{i\phi_R} \cdot \tilde{O}^*$$

这样制备的一张全息图(Hologram)实际上是一张干涉图，它包含了物光波前及其共轭波前的信息。

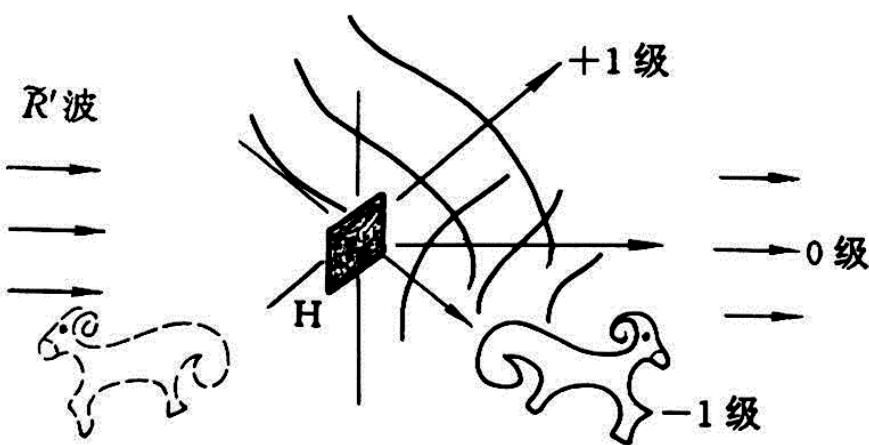
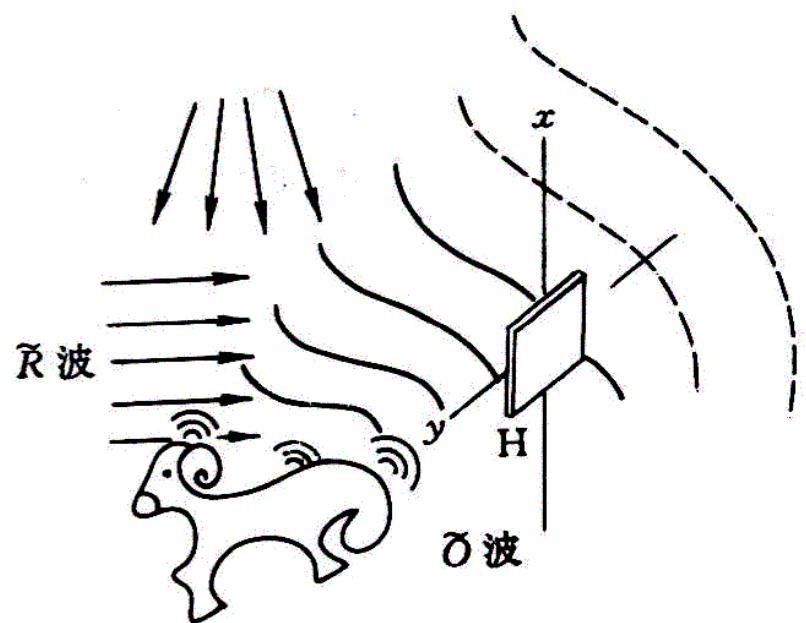
通过对照明光的衍射再现物光波前及其共轭波前。



表 7-3 常用全息记录介质的种类

材料类型	记录过程	处 理	全息图类型	能否重 复使用	保存时间
卤化银乳胶	吸收光子形 成潜像	湿, 化学漂白	振幅型或位 相型	否	永久
硬化的重铬 酸盐明胶	光交联	湿, 化学	折射率位相 型	否	密封后永久
光致聚合物	光聚合	不用, 后曝光 及后加热, 湿	折射率位相 型或表面浮 雕型	否	永久
光致抗蚀剂	形成有机酸 光交联、光聚 合、光分解	湿, 化学或热 空气	表面浮雕型	否	永久
光导热塑片	形成静电潜 像加热产生 变形	电晕放电及 加热	表面浮雕型	可	永久
光致各向异 性材料	线偏振光诱 导	湿, 化学或不 用	双折射率变 化型	否, 可	永久, 几个 月或几分钟
光折变晶体	离子, 电子俘 获	不用	折射率变化 型	可	

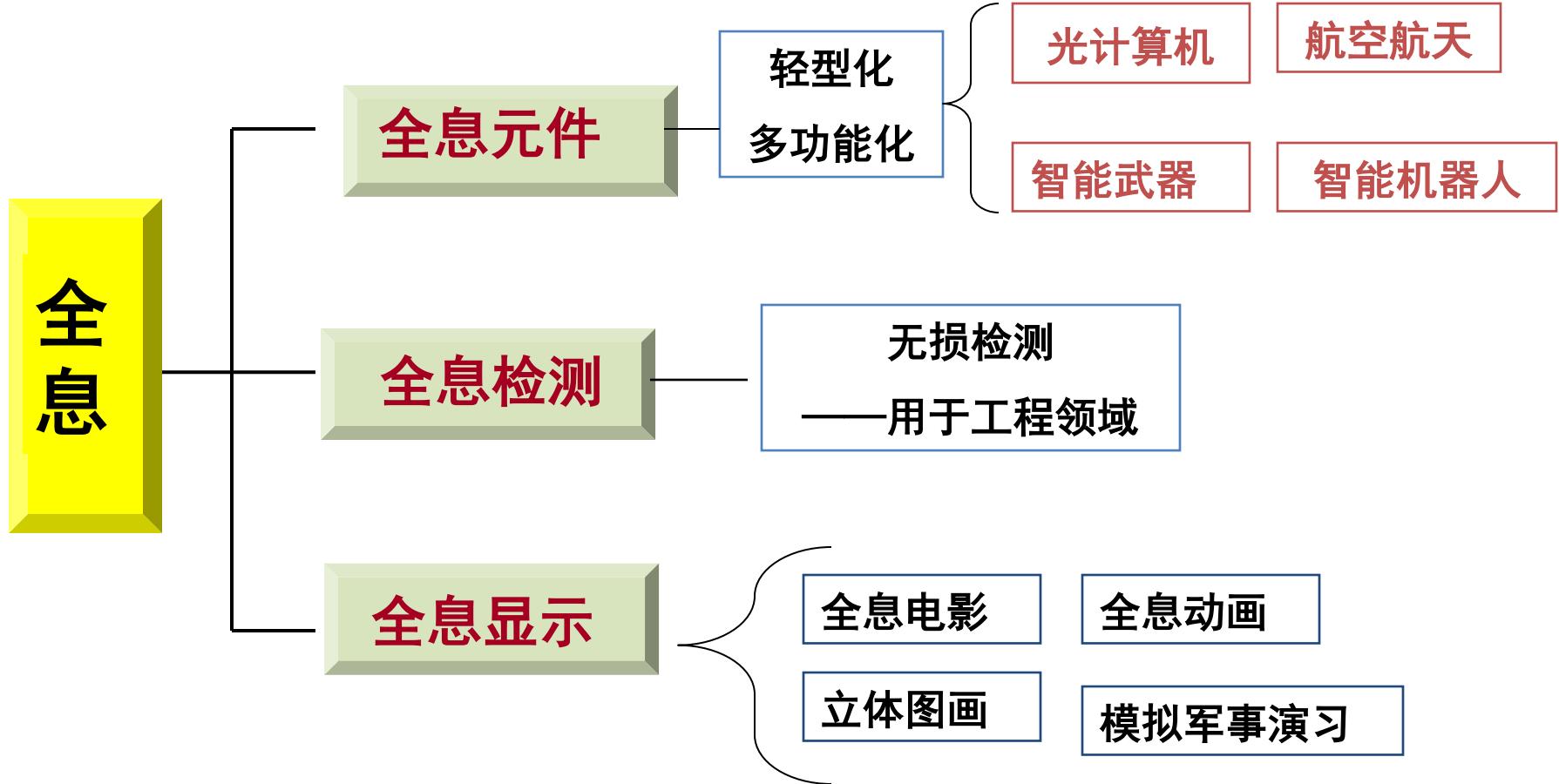
全息图的观察



物体上每一点发出的球面波都贡献于整个记录干版，所以物体和全息图的对应关系是“点面对应”，也就是全息图上每个局部都包含着物的全部信息。

而普通照相物和图的对应是“点点对应”。

全息研究方向及应用领域

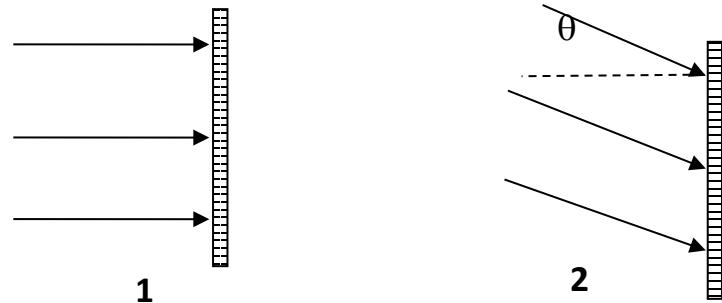


作业

人们记录一束平行光和一束傍轴球面波的干涉场，经过线性冲洗制成一张环状余弦型全息图，其屏函数可表示为：

$$t(x, y) = t_0 + t_1 \cos(\beta r^2 + \varphi_0), \quad r^2 = x^2 + y^2$$

现用平行光照明这张全息图，光波长为 λ ，分析：



1. 照明光为正入射的平行光（见图1），分析衍射光场的主要成分及其特点。
2. 照明光为斜入射的平行光（见图2），分析衍射光场的主要成分及其特点