

- Opr.*, 19(1980), 4116.
- [14] J. Stepelfeld et al., *Phys. Rev. Lett.*, 62(1989), 98.
- [15] U. Buck and H. Meyer, *Phys. Rev. Lett.*, 52, 109. (1984), 109; *Surf. Sci.*, 156(1985), 275.
- [16] W. Kamke, et al., *Z. Phys.*, D14(1989), 339.
- [17] J. Krauss, et al., *Z. Phys.*, D20(1991), 29.
- [18] H. Böhmer et al., *Z. Phys.*, D11(1989), 239.
- [19] M. Feber et al., *Z. Phys.*, D20(1991), 21.
- [20] K. Hesaoha and T. Mari, *J. Chem. Phys.*, 92(1990), 4408.
- [21] M. T. Deluca and M. A. Johnson, *Chem. Phys. Lett.*, 162(1989), 445.
- [22] D. J. Walse and R. S. Berry, *J. Chem. Phys.*, 92 (1990), 4283, 4473.
- [23] Mee Y. Hahn and R. L. Whetten, *Phys. Rev. Lett.*, 61(1988), 1190.
- [24] J. Rosuger and S. Leutwyler, *Phys. Rev. Lett.*, 59 (1987), 1895.

光学显微镜的最新发展

宋葵 李增发 张光寅 颜彩繁

(南开大学物理系, 300071 天津)

光学显微镜技术近年已有革命性发展,应用最新测量技术和最新数据处理技术,已由普通的二维成像发展为三维立体成像。其横向和纵向分辨率有了很大提高。重点介绍了共焦扫描光学显微镜,近场扫描光学显微镜及微分扫描光学显微镜等典型的最新技术的原理,潜力及应用。

Abstract

The revolutionary achievement in optical microscopy has been made recently. Optical microscopy is rapidly developed beyond the traditional two-dimensional imagery into the reproduction of three-dimensional structures by using the latest measuring techniques and data processing technologies. The lateral and vertical resolutions of the observation system have been greatly improved. The principles and potentiality for applications related to the confocal laser scanning microscopy, near-field scanning optical microscopy and differential scanning optical microscopy are introduced in this paper.

光学显微镜的最新发展^[1],已由普通的二维成像发展为三维结构的立体成像。横向分辨率与纵向分辨率有了很大的提高。新的光学技术和日益发展的数字式成像信息处理系统为研究表面结构和立体结构提供了更加有效的方法。

光学显微技术的革命性发展开始于50年代末期共焦扫描原理出现,基于这一原理的共焦扫描光学显微镜已成为三维物体结构再现的有利工具。这种显微镜能消除非焦点结构的信息对成像的影响,实验证明对生物样品的研究具有特别的优越性。例如,用高速扫描共焦成像系统与普通显微镜联合使用来研究生物样品取得了很好的效果^[2]。

扫描隧道显微镜^[3]由于能对样品在原子水平上成像及进行信息处理而受到广泛重视。这一技术的光学模拟技术——近场光学显微镜也同时发展起来。这种显微镜打破了波长限度的分辨率限制,从而可得到更多的样品表面信息。

微分扫描光学显微镜的发展则别具特色与多样性。由于普通扫描显微镜在结构没有变化的情况下也会产生假信号,所以系统的潜在能力不能充分发挥出来。而微分扫描光学显微镜,只有在结构上相邻两点有结构的变化时才能有信号,这样使显微镜的技术指标得到了进一步提高。在这方面近年发展迅速,如微分相位光学显微镜,微分振幅光学显微镜,光导纤维扫描微分相位相干光学显微镜等竞相推出。

近年来在光学显微镜这一研究领域可以说出现了百家争鸣的局面。本文的目的是对以上三类显微镜的原理及一些最新的研究结果作简单介绍。

一、共焦 (confocal) 扫描光学显微镜

J. Z. Young, M. Minky 等人早在 50 年代首先提出了共焦扫描光学显微镜的思想。随后 70 年代 P. Davidovits^[4], A. F. Slomba^[5] 等人进一步研究共焦扫描光学显微镜的原理,使其在实际中得以应用。80 年代,越来越多的人从事这方面的研究,使之成为研究半导体材料和生物样品的重要工具。

共焦扫描光学显微镜的主要思想是共焦,所谓共焦就是指物镜和目镜的焦点重合于一点,物镜和目镜的焦平面重合于样品被探测平面。图 1 是共焦扫描光学显微镜的原理示意图。把光聚焦于一点照射在样品上,同时用“点”探测器来探测样品的反射光,并进行信息处理而给样品上这一点成像。激光照射的焦点在样品上扫描,“点”探测器进行同步记录,这样可以得到整个样品的成像。

如图 1 所示,当样品表面某点正好处于物镜焦点时,探测器测得最大反射光强;反之,则测得较小反射光强。从而给出样品纵向结构信息。

这种显微镜一个突出的特点是排除了非焦

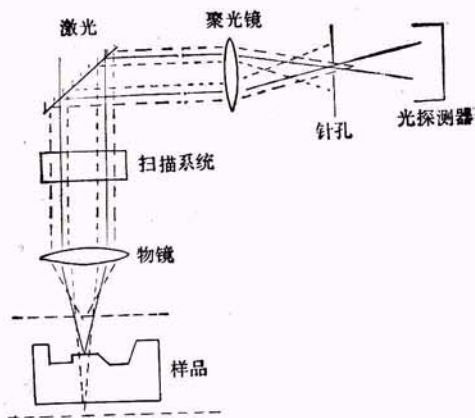


图 1 共焦光学扫描显微镜原理示意图

点的结构对成像的影响。在一般光学显微镜下成像,焦点上和焦点外信息都被探测器接收,然后数字化输入计算机完成显微镜成像,因而需要大量的计算来排除焦点外信息对焦点上成像的影响。当明亮的焦点外区域与阴暗的焦点上区域重叠时,会产生非常严重的测量误差问题,而且要确切地知道物镜的光转换函数也是难于做到的。用共焦扫描光学显微镜可以很好地解决这些问题。从图 1 可以看出:首先,样品处于显微镜的焦平面上,所以激光照射在样品非焦点上的光强很弱;其次,在探测器前放置一个特殊的光阑,而光阑孔正好处于聚光透镜的焦点上,这样来自于样品上非焦点处的光被光阑挡住,从而可以得到高质量的成像。

利用这种技术对生物样品的研究取得了良好的效果。从以下一些实验结果可以明显地比

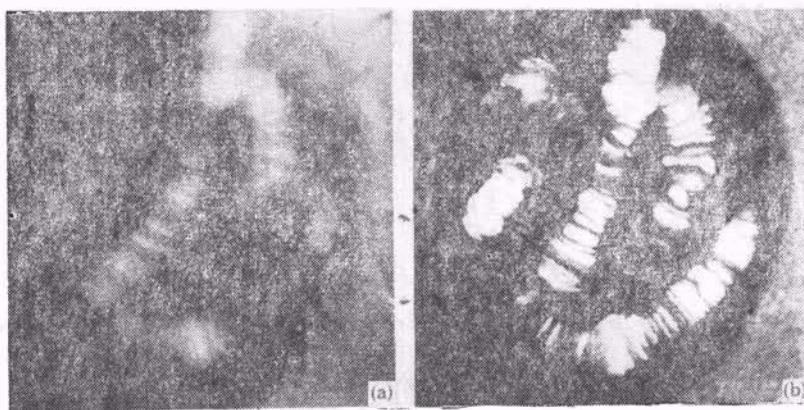


图 2 摇蚊多线染色体原位的荧光成像

较出共焦扫描光学显微镜优越于一般显微镜。

图 2 是摇蚊多线染色体在原位的荧光成像。从图 2 可以看出：[图 2(b)] 共焦成像给出了更多的信息，明暗对比度高，成像更加清晰。

在对一系列生物样品进行实验后，我们可以得出下面的结论：共焦技术确实比常规显微镜成像效果有很大改进。它对较厚样品成像效果上的改进更为显著。

该项技术最好空间分辨率为 $0.5 \mu\text{m}$ 。由于它排除了焦平面外信息的干扰，可以进行逐层层析，所以该项技术还能在三维方向成像，从而显示出样品的三维结构。它在生物医学及半导体工业方面受到普遍欢迎。

这一显微技术在实际中应用也还存在一些困难。例如，实现照明系统与探测系统的同步移动是困难的；再如，分辨率直接与光阑孔径大小相联系，要提高分辨率就要缩小孔径，这就使分辨率的提高受到限制，所以这一技术有待进一步发展。

二、近场 (near-field) 扫描光学显微镜

自从阿贝和瑞利时代起，人们就知道经典光学显微镜的分辨率是受衍射限制的，通过光学系统可以分辨的最小距离是 $\lambda/2$ 。这是因为场与有限大小物体的相互作用可分为两部分：一个是与低空间频率相联系的扩散场， $f < 2/\lambda$ ；一个是与高空间频率相联系的耗散场， $f > 2/\lambda$ 。现在我们了解到，由于物体所传播的远场中不包括耗散场这一项，所以小于波长尺寸物体的探测就有很大的困难^[6,7]。最近，一种新型的扫描光学显微镜——近场扫描光学显微镜或扫描隧道光学显微镜已发展起来。这种显微镜的基本原理是探测小于波长尺寸的物体所传播的近场，这就解决了上述主要问题。

在 70 年代初，Ash 和 Nicholls^[8] 证明了在微波波段的超分辨率显微镜原理。在这以后大约十年内这项技术没有很大发展。直到 1984 年 G. Massey 等人发表了他们最初的实

验结果^[9]，把 Ash 和 Nicholls 的理论扩展到了可见光波段。然后，很多关于近场技术的报告纷纷发表。例如，Ficher^[10] 用一个较大的孔来扫描低于波长大小的结构，并给出了一系列有趣的实验结果，但这些结果由于种种原因难于解释。Massey 把近场成像技术发展到了远红外波段^[9]，这一发展得到很多应用。Pohl 等人研究了被他们称做是“光学诊断器”的超分辨率显微镜^[11]，这种显微镜与 E. Betzig 等人在 1986 年提出的近场扫描光学显微镜 (NSOM) 系统^[12] 相似，但它无论从理论到实验上都还很不完备。此后一些报道进一步完善了 NSOM 系统，并把它应用于生物结构及其他一些微小结构样品。

NSOM 显微镜的最基本思想如图 3 所示。

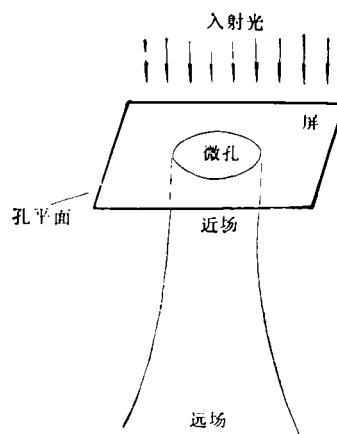


图 3 光通过尺寸小于波长小孔传播示意图

入射光垂直射入带有一个小孔 (尺度小于波长尺度) 的屏上，由于屏是不透明的，入射光透过小孔出射到屏以下区域。在近场区域 (相对于孔平面) 出射光被限制于孔的尺寸范围内，而与入射光的波长无关。在远场，入射光发生明显的衍射效应，以致不能得到孔的几何成像。应用准直现象，可把待测样品放在孔的近场区域内。在这种情况下孔相当于一个光源，它的尺寸不再受几何光学的限制，探测从样品透过的或反射的光可产生一个高分辨率的成像。因为分辨率依赖于孔的尺寸而不是波长，所以如果孔足够小，可得到 10nm 或更小的分辨率。

在此基本理论的基础上，有人提出了反射近场光学显微镜的模型^[13]。它讨论了一个导光的介质尖锥与小于波长尺度粗糙表面之间光的相互作用。这一模型的一种实验方案如图4所示。

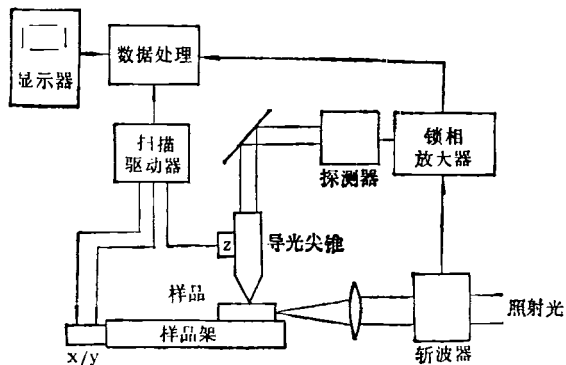


图4 利用内部照明的近场扫描光学显微镜实验装置图

用 He-Ne 激光器做照射光源。透镜把平行光聚焦从侧面照射样品，样品表面外即产生一指数衰减的耗散场。当导光的锥尖处于这一场区时，它即刻把耗散场 (evanescent field) 的光传导给光探测器。计算机对电信号进行数字化处理可得出三维成像。介质锥尖尺寸及其与样品的距离都小于光的波长。

图5是玻璃片上吸附物的三维图像。介质锥尖与样品间的距离不变，玻璃片上吸附物的三维图像横向和纵向分辨率都优于50nm，最高可接近10nm^[14]。不难理解，介质锥尖制作是关键技术之一，锥尖尺寸越小越好，它直接影响图像的横向分辨率。介质锥尖与样品表面间的距离必须足够小，否则达不到近场条件要求，它直接影响图像的纵向分辨率。

近场光学扫描显微镜的实验结果是令人鼓

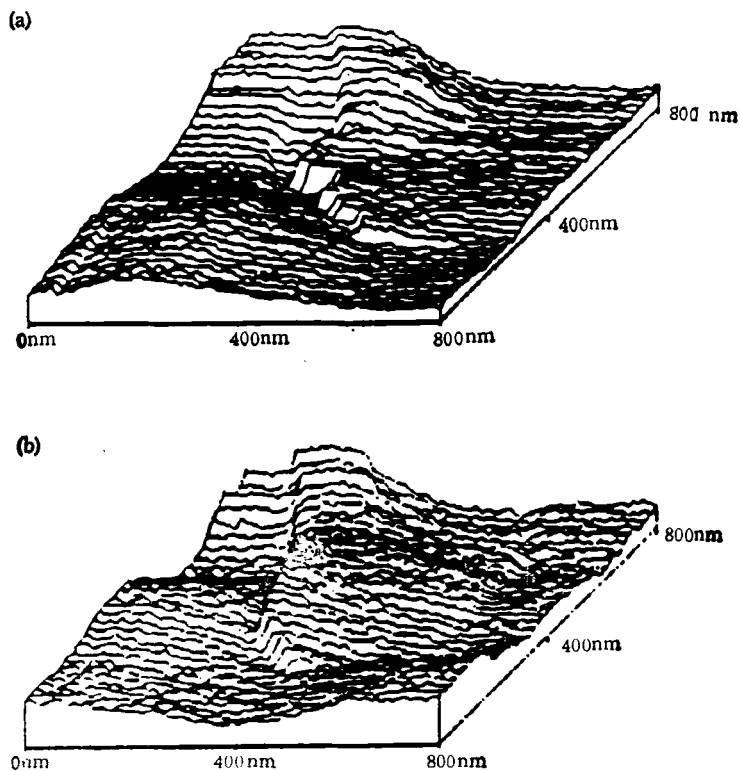


图5 玻璃片上吸附物的三维图像

舞的，其分辨率已达到了很高的水平，尽管还有一些技术和理论上的障碍需要克服，其潜力

还可进一步开发，应用范围还可进一步扩大。

三、微分扫描光学显微镜

微分扫描光学显微镜的发展近来受到非常广泛注意，它是基于比较样品上邻近两点信息不同这一原则来探测样品的。原来的扫描显微镜(SOM)在探测样品时，即使样品结构没有变化，也可能产生假信号，有时又可能丢失信息，这种系统的潜在能力没有完全发挥出来。而微分扫描显微镜，只有当样品上相邻两点在结构上有所变化时才会有信号，这样结构上微小的变化能被探测，大大改进了成像效果并提高了分辨率。对样品相邻两点上信息的比较，可采取不同方法。其中主要是从探测光束上取出相位的信息进行比较而给样品成像，也有些是从探测光束上取出振幅信息进行比较。

外差光学显微镜^[15]用光电的共态抑制技术(而不是用振动诱发光的位相颤动)进行光的外差精密位相测量，它能分辨出 0.01° 的相位变化。它是用两同心光束聚焦在样品上，测出反射光束之间的相对位相差。这个无触点的光学显微镜即能探测平滑高反射的表面，也可以探测粗糙的表面。

光导纤维扫描微分干涉比较光学显微镜^[16]不需要光学装置，只需简单的探测系统。它借助于光导纤维，省去光路设计，而且系统很容易转换成全光纤表面声波传感器。

相敏扫描显微镜^[17]可直接检测样品反射光的幅度和位相，因而能获得复空间变量的傅里叶变换，能消除光学系统引起的像差的影响，它的深度分辨率优于 10nm ，对机械振动不敏感。

如图6所示，微分振幅光学显微镜(DASOM)^[18]的工作原理是基于：在很小范围内正弦地移动光束焦点来探测样品。在张华西的实验中，He-Ne激光光束首先通过一个驻波声光偏转器，驱动频率是 1.7MHz ，而产生照射光斑在物体表面很小范围内正弦移动。这样，样品表面任何结构变化如外形或反射率变化都会使反射光束产生一交流信号，从这个信号的强度上可以检测出样品表面及亚表面机械

物理

结构和光学性质。经计算 DASOM 系统的信噪比比普通光学显微镜的信噪比高得多。在理想实验条件下，选择最优参数，这种系统的分辨率可以达到 $0.46\mu\text{m}$ 。

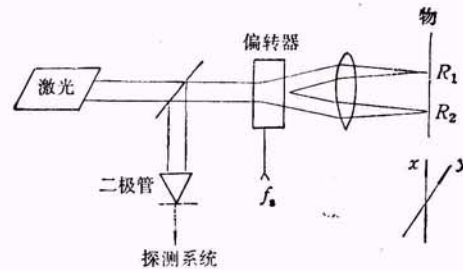


图6 微分振幅光学显微镜示意图

在张华西和 M. Vaez Iravani 的实验中得出了金属粒状结构，磨光金刚石表面及掺杂硅晶片的成像结果，对谱线宽度进行了精确测量，并对其重点加以分析。图7是 SOM 系统和 DASOM 系统分别对晶体管管芯线宽的测量结果。SOM 系统虽然能显示样品的结构，却

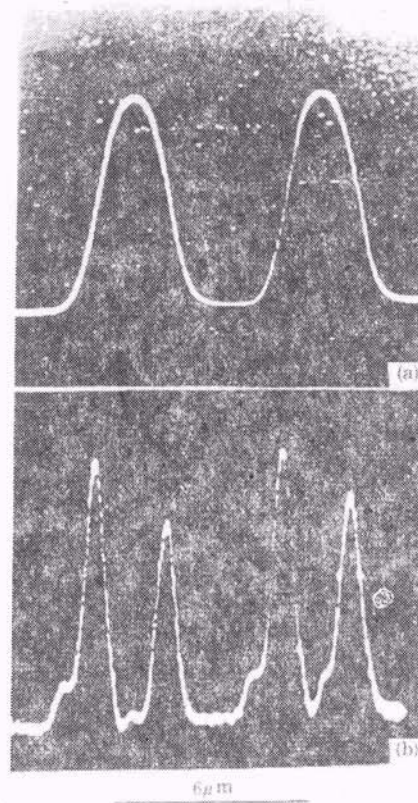


图7 SOM, DASOM 系统对晶体管管芯线宽的测量结果

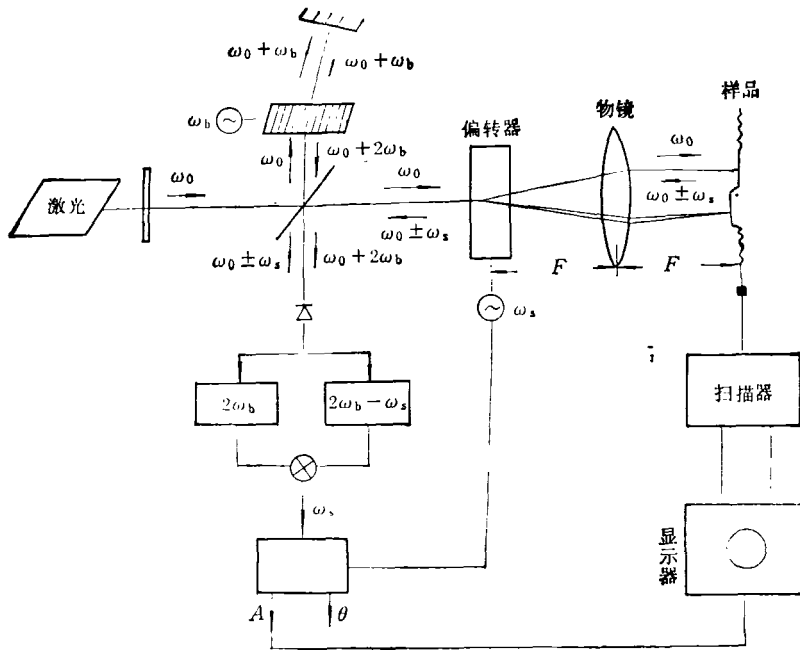


图8 微分相位比较光学显微镜结构图

不能正确显示线宽度(尤其当扫描光斑的直径较大时);而 DASOM 系统则能给出更可信的信息(即使在焦点直径接近线宽度的情况下)。当带宽是 10Hz 情况下, DASOM 系统可探测的样品反射率变化量达 3×10^{-7} 。

扫描微分相位比较光学显微镜(SDPOM)^[19]的结构图如图8所示。任何相结构的变化如外形或反射率的变化都会对光束在 ω_c (声光偏转频率)进行相调制。而被调制的反射光再与参考光束相干涉,最后经过解调可取出样品表面的信息。SDPOM 系统对加在物光 ω_c 上的相移非常敏感,理想情况下系统所能探测的最小相位变化 $\Delta\phi_{\min}$ 可达 7×10^{-4} rad。张华西等人实验给出的结果比 Nomarski 用微分干涉显微镜给出的结果优越得多。

除了以上我们重点介绍的几类显微镜,其他还有一些类型的显微镜也相继发展起来。例如,扫描隧道显微镜,它的原理与近场显微镜相似,但后来作为一个独立的分支发展起来,这里不再赘述。

本文介绍了光学显微镜近年在分辨率和三维成像方面的突破性进展,这些技术的应用与

许多科技领域有关,所以受到了普遍关注。在其他一些领域,如半导体及半导体薄层材料的表面及亚表面缺陷诊断和成像检测,也取得了令人鼓舞的进展^[20]。它们在现代科技的发展中起了巨大的促进作用。

[1] T. C. Stand and E. W. Hansen, *Appl. Opt.*, 29(1990), 3725.
 [2] W. B. Amos et al., *Appl. Opt.*, 26(1987), 1239.
 [3] J. M. Huerra, *Appl. Opt.*, 29(1990), 3741.
 [4] P. Davidovits et al., *Appl. Opt.*, 10(1971), 1615.
 [5] A. F. Slomba et al., *Opt. Lett.*, 3(1978), 115.
 [6] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, McGraw-Hill, New York, (1968), 49.
 [7] E. Wolf et al., *J. Opt. Soc. Am.*, 2(1985), 886
 [8] E. Ash et al., *Nature*, 237(1972), 510.
 [9] G. Massey et al., *Appl. Opt.*, 23(1984), 658.
 [10] U. Fischer et al., *J. Vac. sci. Technol.*, B3(1985), 586.
 [11] D. Pohl et al., *Appl. Phys. Lett.*, 44(1984), 651.
 [12] E. Betzig et al., *Biophys. J.*, 49(1986), 269.
 [13] D. Courjon et al., *Appl. Opt.*, 29(1990), 3734.
 [14] B. Labani et al., *J. Opt. Soc. Am.*, 7(1990), 936.
 [15] C. C. Huang, *Opt. Eng.*, 23(1984), 365.
 [16] M. Vaez Iravani, *Electronics Lett.*, 22(1986), 103.
 [17] R. I. Jungerman et al., *Appl. Phys. Lett.*, 45(1984) 846.
 [18] C. W. See et al., *Appl. Opt.*, 27(1988), 2786.
 [19] C. W. See et al., *Appl. Opt.*, 24(1985), 2373.
 [20] M. Tajima et al., *J. Crystal Growth*, 103(1990), 146C