

显微镜概述

侯淑莲 李石玉

(华北煤炭医学院物理教研室 河北唐山 063000)

人类总要不断探索微观领域的秘密,要亲眼见到超微尺度的自然现象,显微镜是人们所能依赖的最好工具。在历史的长河中,显微镜经历了光学显微镜,电子显微镜,扫描隧道显微镜,扫描探针显微镜的漫长历程。由于显微镜的研制也曾造就了四位诺贝尔物理奖得主,显微镜促进了科学技术的发展,特别早期对生物医学领域做出重要贡献,而科学技术的发展及理论突破又是产生更新型显微镜的温床和催化剂。

一、光学显微镜

人类对于生物微观世界的认识,有着一段漫长的历史,与显微镜的发明与改进密切相关。荷兰人列文虎克(1632—1732)创造成功世界上第一架显微镜,由于初期复式显微镜有严重缺陷,它把毕生精力用于发展单式显微镜上并成为显微镜学和微生物学的开拓者。第一个设计较好性能较高的显微镜是物理学家胡克(1635—1702)制做的,并首次提出“cell”这个词。推进了细胞学的建立。随着显微镜的不断改进,加上切片机的发明及固定染色等技术的进步,凡是光学显微镜能看到的一切细胞构造,都于19世纪最后30年中发现。在显微镜的发明和改进的基础上建立了细菌学,明确了细菌的致病作用,德国人柯赫因此荣获1905年生理医学奖。当时对光学显

微镜的最主要改进是消除象差。至1830年英国科学家利斯特向英国皇家学会宣读了“论显微镜的改进”的论文,提出由火石玻璃与冕牌玻璃制成的物镜消除了色差与球差,这就是至今仍在使用的利斯特物镜。这个发现使得物镜制造从全凭经验进入到理论计算的阶段。光学显微镜发展中转折性的飞跃来自德国物理学家阿贝。1873年阿贝和亥姆霍兹各自独立发现光学的正弦条件。阿贝还从他的成像公式推导出了众所周知的关于显微镜的分辨距离的公式,光的衍射效应限制了光学显微镜进一步提高分辨率的可能性。依据阿贝的公式他提出了“数值孔径”这个名词。在前人(如胡克)工作的基础上,阿贝于1878年设计成功浸没物镜。在以后关于光学显微改进工作中一方面努力减少象差提高成像质量,另一方面就是提高数值孔径,减少用光波长以提高分辨率,向极限分辨率迈进,随着用途的不同至20世纪前半叶已制成各种显微镜,如暗场显微镜、紫外显微镜、偏光显微镜、相衬显微镜(其发明者荷兰的泽尔尼克获1953年诺贝尔物理奖)、荧光显微镜、干涉显微镜、离心显微镜、倒置显微镜、体视显微镜等等。由于探测精度被阿贝散射限制,观察的分辨率只能到几百个纳米,放大倍数为几千倍。这对于生物观察来说只能停留于细胞水平,对于介于细胞水平和分子水平的亚显微结构就无能为力了,更不用说分子水平的超微结构了。人们曾寄希望于减小波长用波长更短的光源—紫外光,1904年柯勒等

来表示则很方便。 Av_{18} 和CD-Bonn势,作为高精度NN势模型,虽然它们的数学结构差别很大,但在各自有效的范围内却能预言完全相同的相移。

电荷相关的高精度现代NN势,是近年来日益精确的多体计算所需要的。迅猛发展的计算机技术,使这些多体计算成为可能,这为我们在核子相互作用层次理解核结构提供了前所未有的机会,同时,也使得在检验CIB和CSB的微弱作用方面的研究显得更加重要。

总的来说,核力的电荷无关性和电荷对称性都是理想的情况,是对实际核子-核子相互作用的良好近似,其不确定程度仅约1%左右。然而,随着实验技术的进步和理论计算能力的大幅度提高,90年代以来,这1%左右的不确定性已成为实验和理论上不可忽视的因素。各种新型核力势模型都不再是电荷无关的,而是包含了电荷无关性破缺和电荷对称性破缺。对于这些破缺的根源及其在核现象中表现的研究正进一步丰富人们对核力和原子核的认识。

制成了紫外显微镜,分辨本领虽有所提高,但达不到预期的 100nm,且技术非常复杂价格昂贵不能普及。但却意外地发现它对生物核酸物质在 260nm 处有强烈地吸收,可见光对核酸物质却是透明的,使得紫外显微镜成为研究核酸的有力武器。

二、电子显微镜

就在没有什么好方法大规模提高光学显微镜分辨率的时候,20 世纪初物理学的发展为新的显微镜的发明奠定了基础。1926 年德国物理学家 H·布施提出电子射线受电场或磁场作用发生聚焦而成像,这就打开了电子光学的大门,并研制出了第一台电子透镜。20 世纪之交正是物理学的鼎盛时代,新发现、新理论、新概念不断涌现。1923 年德布洛意提出了物质波的概念,并给出了波长与粒子动量的关系。1927 年美国物理学家戴维逊·革末和英国的 G·P 汤姆孙用电子衍射实验证实了电子波的存在,为电子显微镜的研制提供了理论和实验的基础,他们分获 1933、1937 年诺贝尔物理学奖。1932 年德国物理学家 M·柯诺尔,E·鲁斯卡等人首次发表了关于电子显微镜的实验和理论研究的论文,并试制成功第一台电磁式透射电子显微镜。为了获得较大的放大能力,人们又研制了短聚焦的电磁透镜。到 1934 年鲁斯卡和马顿又分别制成了新型复式电子显微镜。透射电镜的原理是电子枪产生的电子束经电子透镜会聚后打在样品上,与样品产生相互作用,穿过样品的电子束带着样品结构的各种信息,再经几级电子透镜放大在荧光屏或照相底片上形成分辨率极高的图像。电子透镜一般分为静电透镜和磁镜两种,静电透镜又称电透镜,由于它的象差较大,所以在现代电镜中除电子枪外很少使用。一般电镜为了获得高放大倍数采用三级或四级以上成像系统,分辨率可达 0.2nm。它的实际分辨本领往往小于理论值。按照阿贝极限分辨率 $\lambda/2$ 的理论,当用 50KV 加速电子时,电子的 $\lambda = 0.00536\text{nm}$ 仅相当于光波长十万分之一,已远小于电镜的理论分辨本领 0.2nm。电子显微镜中成像媒介已不是限制分辨本领的因素,成像透镜的各种象差成了限制分辨本领继续提高的主要因素。电镜使得化学鉴定和结构测定达到了一个新的水平,特别是对于生物医学的发展起到了前所未有的推动作用。如用光学显微镜虽然可以看到细胞和细菌,但只能达 200nm 的分辨率,不能观察分子或原子的排列,构成及它们和细胞机能的关系。电子显微镜使研究深入到了细胞大分

子结构中,甚至形态学的描述语言也换成了化学和物理化学的语言,充实深化了关于生命结构的资料。使得生态和功能更好地结合起来。因在本质上现代生物化学所研究的大部分过程一定程度上都发生在细胞组织的亚细胞水平上,电镜把从形态学观点研究生命现象和从分子水平上研究生命现象的方法联接到一起,所以它对于生物化学和生物物理的发展对于分子生物学的建立起到了促进作用。结病理学家、病毒学家、农业生物学家配置了有力工具,并直接为生物医学和工农业生产服务。我国曾于 70 年代成功试制 80 万倍电子显微镜,其极限分辨率达 0.144~0.2nm,具有当时国际先进水平。

由于电子束穿透能力很弱,一般透射电镜只限于观察极薄的样品,尤其对于生物切片大于 $100\mu\text{m}$ 就不行了,另外在许多情况下不需达最高分辨率,而只要求在自然状态下观察。特别是观察凹凸不平的样品和金属断口,农作物生产情况,催化剂等,要求的是长景深,大观察范围,简单地样品制作或满足立即观察的需要。这些透射电镜均不能很好满足。于是人们提出了扫描电镜的设想。实际上扫描电镜的设计思想和它的工作原理早在 1935 年就由德国柯诺尔提出了,1940 年英国剑桥大学试制成功,它的分辨本领已略优于光学显微镜,但离实用还有一段距离。因当时全部电镜工作集中在提高分辨本领和放大倍数方面,使扫描电镜工作被延误了一段时间。后来在透射电镜和电子探针发展的基础上,扫描电镜有了很大改进。扫描电镜的工作原理是电子束经磁透镜(或电子透镜),一般经多个磁透镜多级缩小成极细的电子束(电子探针)以扫描的方式打在试样表面上。由探测器分别接收从试样上产生的二次电子,吸收电子、背散射电子、俄歇电子及透射电子等一系列信息,经电子电路放大后以扫描方式在显象管上成像。1955 年全世界只有 2、3 台,到了 1973 年就达到 2500 台以上,我国 1973 年开始试制,1975 年有产品出厂。与透射电镜比较,扫描电镜能直接观察较大尺寸的样品的原始表面,对样品形状无限制,还可观察粗糙表面,样品制备相对简单(真空镀膜)观察样品的视场较大,影像比透射电镜大几十倍,放大倍数可变范围宽,对厚块样品分辨率高,对样品污染少,所以比较有利于生物观察。用它还能观察某些动态如弯曲拉伸过程等,对微区分析也较方便。后来又发展了超高真空扫描透射电镜,分辨本领在实验室中已达到 0.3nm,相当于一般透射电镜的水

平,但这种仪器必须在超高真空 10^{-10} 托下工作,使用范围操作性能远不如一般电镜。在透射电镜,扫描电镜的基础上附加各种探测器。谱仪和分析用的电子计算机等附件,则组成了综合分析电镜,美国 ARL 公司的扫描电镜光量计可装 12 个固定光谱仪或装 2 个扫描线光谱外加 8 个固定光谱仪,能同时分析多种元素。

三、扫描隧道显微镜

随着材料科学、生命科学等学科基础研究的纵深发展,特别是在分子原子水平上对“超微结构”的研究,普通的扫描电子显微镜已不能满足需要。透射电镜虽能达到较高分辨率,但由于样品制备的困难加上对样品破坏严重不能实际应用,测量过程要求的真空条件也显得很麻烦。幸好物理学的新理论、新的思维方式促进人们不断创新。1981 年联邦德国学者宾尼和瑞士学者罗雷尔将样品本身作为一个电极,另一个电极是一根非常尖锐的探针,在样品和探针间加上电压,并将探针向样品表面靠近,当针尖与样品表面达几个纳米时由于隧道效应,针尖和表面之间就产生隧穿电流 I_t 。 I_t 强烈地依赖于针尖与样品之间的距离,将针尖在样品表面扫描,若表面有微小起伏,即使只有一个原子大小,隧穿电流也会发生极大地变化,将变化信号输入计算机就给出样品表面的形貌轮廓。这就是扫描隧道显微镜 (STM),放大倍数三亿倍,分辨间距横向 0.01nm,纵向 0.001nm,只有原子直径的 $1/10$ 。他们和鲁斯卡一起获 1986 年诺贝尔物理学奖。它的发明实现了人们直接观察生物大分子和重金属原子图像的愿望。使医学、生物学的研究水平提高到分子细胞学的水平,为纳米材料的研究加工提供了有力的工具。并为测试大规模集成电路、光盘、磁盘、碳纤维、电池材料和镀膜镜面提供了广泛应用的可能性。

四、扫描探针显微镜

由于 STM 在操作中需施加偏压,因而只能对于导体和半导体进行直接检测。这就使非导体和生物活细胞的研究不方便。宾尼和奎特、格伯等从探针与样品间电相互作用受到启发,除了外加电场产生隧穿电子作为检测信号外,能否利用针尖与样品间原子斥力作为信号呢? 1986 年他们研制出原子力显微镜 (AFM),它的出现使扫描探针显微术很快发展起来。在无外场时根据探针与样品间的电、光、力、磁、热等相互作用,研制了对摩擦力成像的摩擦力显微镜 (LFM),对磁力成像的磁力显微镜 (MFM),对

静电场成像的电力显微镜 (EFM),对界面无损伤成像的弹道电子发射显微镜 (BEEM),能克服半波长局限的扫描近场光学显微镜 (SNOM),能探测离子通道的扫描离子电导显微镜 (SICM),能对微区热量进行探测的扫描热显微镜及扫描分子显微镜,范德瓦尔斯显微镜等构成了新的扫描探针显微镜家族。突出优点是三维成像纵向分辨率高,且使用条件比较宽松,例如可以在空气或液体环境中成像。

1. 基本原理和操作模式

所有扫描力显微镜都有一个一端固定而另一端装有探针的弹性微悬臂用以检测样品表面形貌或其他表面性质,针尖在样品之上能沿 x, y 方向扫描,周围环境可为空气或液体。针尖与样品的相互作用力(一般与距离有关,可能是吸引的也可能是排斥的)就会引起微悬臂的形变(或偏转)。nN 的力即可引起 nm 的形变。在探针的正上方是激光器,它发出的激光经微悬臂背面反射到光电检测器上能接收和放大这些形变,例如 0.01nm 的形变能放大为 3~10nm 的位移,足以产生可测量的电压差。无论垂直的或扭转的形变均能检测到。但这个信号一般并不用来直接成像,而是输入一个反馈电路,它产生的信号能控制样品表面与针尖表面的距离。距离取决于选择的模式,无论何种模式都用压电激励方式实现,保证非常精确的 x, y, z 移动。

从操作模式上看分为接触模式和非接触模式。接触模式又分为连续性接触(接触扫描)和间断性接触(轻敲式),物理上所谓接触是指针尖和样品各自原子间有库仑相互作用时称之为“接触”,此时针尖和样品原子中电子间的相互排斥阻止了针尖和样品的进一步接近。这种库仑斥力使微悬臂发生形变,且形变与表面形貌对应,从检测系统输出信号直接成像,是非常灵敏的模式,又叫力模式。它的缺点也很大,对于急速变化凹凸不平的表面产生比较大的力,甚至损坏针尖和样品表面,为克服这个缺点,输出电信号被输入反馈回路,用压电激励器去调整微悬臂高度,保持样品上的力恒定,即微悬臂的高度恒定。因为反馈回路信号会随样品表面形貌而变化,因而得到样品表面上的三维图像,反馈操作形成的象又叫做误差信号。对于软的或生物材料适用轻敲式。这种模式扫描过程中微悬臂是振荡的,振幅比较大(大于 20nm)频率为 100~1MHz。针尖仅瞬间与样品表面接触,也能在空气和液体中成像。它是利用压电晶体,在微悬臂共振频率附近驱动微悬臂

振荡,反馈系统通过调整针尖一样品间距来控制微悬臂振幅,即作用在样品上的力恒定,从而得到表面形貌。在非接触模式中,针尖与样品间相互作用力是很弱的范德瓦尔斯力,探针控制在样品上方5~20nm距离处扫描。由于吸引力是比较小的力,为了提高信噪比,须在针尖上加一小的振荡信号。针尖和样品间距是通过保持微悬臂共振频率或振幅恒定来控制的。这种模式操作比较困难且不适合液体中操作。

2. 几种扫描力显微镜简介

首先看原子力显微镜。由于原子力显微镜不受样品导电性的影响,其研究对象不受什么局限。从理论上讲原子力显微镜所观察到的图像比STM更易于解释,因为原子力的等高图比态密度的等高图更忠实于真实的表面形貌,所以宾尼在1986年研制出第一台AFM后一直把注意力放在这方面,通过逐步改进,AFM的分辨率已逐步赶上STM,尤其对生物材料能在生理条件下成像,样品制备简单,甚至可以不做任何物理化学处理,具有独到的优越性,越来越受到人们的关注。AFM的组成关键是微悬臂与针尖。针尖要足够锐利,其参数主要是针尖半径、圆锥角半径及针尖高度、微悬臂的基础力学是它的弹性系数和固有频率。弹性系数是指施加于自由端的力(N/m)与偏转的比率。测量力一般比较困难,但可以通过悬臂形状及作用模式进行计算。最合适的值由动作模式和考察方法决定。比如接触模式中力过大会在样品上产生划痕,所以需要较小的力。在非接触模式中针尖在样品上方以它们的固有频率做小振幅振动,需要较大的力。若微悬臂比较软,由于范德瓦尔斯吸引力将达不到样品表面,但力太大了微悬臂接触了样品得到了也是错误信号。在间断接触模式中,微悬臂以接近其固有频率的频率振动也需较大的力,以便使微悬臂有足够的势能在轻敲样品后由表面撤回。力的典型值对于接触模式是0.01N/m~1N/m,对于非接触模式和间断接触模式是1N/m~100N/m。微悬臂的固有频率必须足够高,以免限制扫描速度,值在几千个赫兹。对于非接触模式或间断接触模式,一般在500KHz以下,若在液体中间断接触模式微悬臂固有频率范围可更低一些,可在30KHz左右。通过解运动方程,解本征值可计算比较

规则的微悬臂固有频率,如矩形的 $F_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^*}}$ 这

里 k 是力(N/m), m^* 等于微悬臂质量的0.24倍。对于三角形的通过一些数学处理也能近似给出。另一个主要参量是共振量 Q , 即品质因数。它等于它的固有频率与衰减了dB时频率间距的比值。它标志着微悬臂阻尼振动衰减造成的损耗。在空气中的损耗主要来自于空气的湿度,对于非接触模式希望有比较高的 Q 值,以提高灵敏度。一般为100~300。在真空中对于碳化硅微悬臂能增加至20,000以上。微悬臂还应足够的大和长,以使激光点较容易地会聚于微悬臂的端点及充分地去接近样品,但又不能太长,因长度增加使偏转系统灵敏度降低。一般长度为100 μ m到400 μ m,宽20 μ m~50 μ m,厚度在0.4 μ m至几个微米之间。

摩擦力显微镜用来研究材料表面不同成分间形貌难以区分,而摩擦特性不同的多组分材料表面。采用接触模式,原理与接触模式AFM相同。由表面形貌引起的微悬臂形变大小也是通过聚集在微悬臂上的激光束反射到光检测器4个象限中强度差值来计算,只不过由于摩擦力的横向作用,突出了微悬臂的扭转形变,摩擦力增大使扭转程度增加。激光检测器及时地分别测量并记录形貌和横向力数据。

磁力显微镜用于检测磁性材料。是磁性材料表面磁结构测量的有力工具,对磁记录介质和磁头能作精细的研究,且样品准备容易,特别对磁性薄膜样品可直接测量。对于有薄的不透明覆盖物的磁性材料也能直接测量,且得到的是三维磁力图;比过去的各种显微镜均有优越性,工作原理与非接触模式的AFM类似,但采用磁性针尖。针尖与样品间距比AFM非接触模式要大一些,一般为10~200nm。针尖沿长度方向磁化以保证针尖与样品相互作用发生在针尖部位,获得较高分辨率。一般把样品固定于压电扫描器上,采用动态检测即磁针以60~100KHz频率上下振动以提高信噪比。MFM只对样品上杂散磁场的 Z 分量 H_z 及其梯度分布 $\partial H_z / \partial z$ 敏感。在动态检测情况下磁针尖和 H 的相互作用,使针尖的共振频率 f_0 和位相 ϕ 改变。由于共振频率改变量和位相的改变量 Δf 、 $\Delta\phi$ 与探测点磁力梯度相关,可通过保持 $\Delta\phi$ 不变探测 Δf ,也可以保 Δf 不变探测 $\Delta\phi$ 。在样品同一面积上扫描两次,第一次采用轻敲式得到样品形貌图,然后抬高针尖达一定高度并保持不变沿第一次扫描轨道进行第二次扫描。这样对同一位置可同时获得样品表面的形貌与磁畴结构的对应关系,更好地观察样品微磁结构。电子显微

镜(EFM)是使用带有电荷的探针,也是采用上述交错扫描技术。获得信号的方法是样品上方存在电场梯度,使得探针与样品间产生静电力,使受迫振动的探针的共振频率发生变化,把此信号输入反馈电路使加在Z轴压电探测装置上的电压发生变化,此变化控制微悬臂共振频率保持不变。这个电压变化可以表示样品表面电场分布的信息。此种显微镜对半导体器件设计研究非常有利。

近场扫描光学显微镜虽然不是电子显微镜,但它是随着扫描探针技术发展起来的。各种力扫描探针显微镜虽各有千秋,如STM和AFM分辨率能达到观测单个分子,但仍有电场或接触力的作用,对探测软的有机体有影响。用光学显微镜就没有这个问题。由于过去用的光学显微镜都是远场观测探测精度受阿贝散射限制,极限波长为 $\lambda/2$,达不到所需分辨率。而近场光学(探测距离小于波长)则打破了 $\lambda/2$ 精度限制。探测系统中反馈、扫描控制及信号处理系统与扫描隧道显微镜或者原子力显微镜有相

似之处,不同之处是传输元件。近场扫描光学显微镜探测的是光场用的是光纤等传输光波的器件,接受用的是光电倍增管。其装置的关键在于探针,非常尖且要有足够的强度。探针越细分辨率越高。探测时用针尖在贴近样品几纳米至几十纳米处很快地扫描,满足近场条件。收集样品表面迅衰场做为获取图像和光谱的信息。精度可达 $\lambda/2000$ 。为了提高信噪比也采取调制技术,让针尖以一定频率上下振动,对针尖上的扩散光加以调制,以区别环境的杂散光。和普通显微镜一样采取等高、等强度两种工作模式。等高模式控制探针在恒定高度上扫描,测样品区域光场强度。等强模式控制探测的光强度为恒定值,记录扫描时探针高度。二种模式都能在一定程度上反映出样品信息。虽然这类显微镜已广泛用于与光场信号有关的观测上,但目前在理论和实验上还存在着一些困难。最突出的是样品与信号的吻合问题。需要人们做进一步的完善和探索才能成为成熟的观测工具。

任一角三等分多用尺

任一角三等分多用尺的使用是基于本发明者尺(无刻度)规作图原理的发现: A 为圆心, AB 为半径划弧交另一边 C ,中线 AD 与 \widehat{BC} 相交于 A' ,以 A' 为圆心,寻找作 O 和 O' 点,始终 $\widehat{A'O} = \widehat{A'O'}$ (不相等时可以收缩或放开点圆规,从而使 $\widehat{OO'} = \widehat{OB}$),连结 AO 和 AO' , $\angle 1 = \angle 2$ (同圆相等弧所对应圆心角相等), $\angle 3 = \angle 4$ (等量相减差相等),任一角 A 被三等分(图1)。任一角三等分多用尺的中线 $A'D'$ 与 $\angle A$ 中线 AD 始终重合,并上下移动,使三等分线 $A'E$ 和 $A'F$ 所夹弧 $\widehat{OO'} = \widehat{OB}$,用笔点下三等分尺的 A' 、 E 和 F 点,拿走三等分尺,连结 AO 和 AO' ,任一角 A 被三等分(图2)。用三等分尺通过别的作图形式,也能把任一角三等分。

联系人:沙伟 (650033)云南省昆明市西站林岗小区A幢5单元101室。

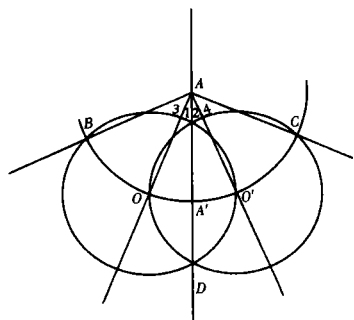


图 1

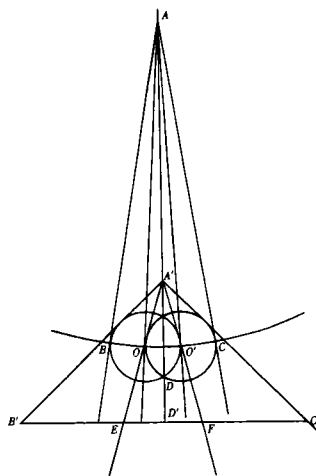


图 2