

# 激光扫描共焦荧光显微系统研究\*

张 平 吴 震 向际鹰

(华中理工大学光电子工程系, 武汉, 430074)

摘要: 讨论了激光扫描共焦荧光显微系统的光学设计问题, 成象机理, 参数确定及其设计关键, 介绍了高精度光学扫描器件的设计方法及实现荧光共聚焦成象中成象器件的优化设计。

关键词: 激光扫描 共焦 显微术 光学系统

## Research on laser scanning confocal fluorescent microscopic system

Zhang Ping, Wu Zhen, Xiang Jiying

(Dept. of Optoelectronic Engineering, HUST, Wuhan, 430074)

**Abstract:** The laser scanning confocal fluorescent microscope has the feature of high longitudinal resolution power and can provide clear 2-dimension or 3-dimension medical image. The purpose of this paper is to introduce the optical design, imaging principles and key points of design of the laser scanning confocal fluorescent microscope system. To achieve high quality imaging, it is important to realize the precision laser optical scanner and optimize the design of imaging components.

**Key words:** laser scanning confocal microscopy optical design

### 引 言

激光扫描共焦荧光显微镜(LSCFM)具有很高的纵向分辨率,它能形成高分辨率的二维层析象和三维立体象<sup>[1]</sup>,使其在生物医学领域得到了广泛的应用。

我们建立的激光扫描共焦荧光显微系统是以重庆光仪厂 XQF 显微分光光度计的主机为基型,增设了激光光源,扩束系统,光学扫描系统,光电探测,电子控制及电脑图象处理系统。为了探测到被激发的微弱的荧光,需注意下列三点:(1)须采用高质量的扫描成象系统。(2)共焦小孔和扫描器件的优化设计<sup>[2,3]</sup>。(3)特殊的图象补偿方法。现就前两个问题进行一些研究。

### 一、激光扫描共焦荧光显微系统

激光扫描共焦荧光显微系统由光学扫描系统和图象采集、处理两大部分组成。

光学扫描系统采用  $Ar^+$  激光器作光源,经光学系统会聚成衍射极限的共焦光斑入射在试样上。被激发的荧光通过光学系统成象,被光电倍增管接收,实现了共聚焦成象。为了得到试样的三维图象,须对  $x, y, z$  三个方向进行扫描,利用工作台  $x, y$  方向扫描完成平面粗扫工作,以便于精确定位,其精度为  $2\mu m$ ,可调范围为  $50mm \times 30mm$ 。工作台  $z$  方向扫描决定层析的厚度,扫描精度为  $1.5\mu m$ ,扫描试样最大厚度可达  $100\mu m$ ,可连续采集几十帧图象。用上海激光技术研究所生产的检流计振镜作行扫描器,用 36BF003 型步进电机作为帧扫。图象采集分  $256 \times 256$  和  $512 \times 512$  两种方式,采集一帧  $256 \times 256$  图象时间为 1s,采集一帧  $512 \times 512$  图象

\* 国家自然科学基金资助。

需 4s, 二维扫描各点之间的定位误差小于象素间隔的 10%。

图象采集处理系统包括光电探测信号处理, 信号采集及电脑图象处理, 用 GDB-223 型光电倍增管接收被激发的荧光, 微弱的荧光信号经放大后通过数据采集系统进入带有协处理器的 386 微机, 采集后的层析图象经图象变换, 平滑, 增强, 特征提取等处理; 考虑到激光束穿越试样进入深层及荧光从试样深层返回过程中发生的吸收和散射, 以及离焦和折射率变化产生的象差等因素造成图象的失真和湮没等因素, 应该进行图象补偿, 修正和恢复, 将层析图象重构成三维图, 以显示被测物的三维形态及内部结构。

### 二、激光扫描共焦荧光显微光学系统成像原理及参数确定

设计成的激光扫描共焦荧光显微光学系统如图 1 所示。488nm, 514nm 的激光从 Ar<sup>+</sup> 激光器 1 发出后经准直扩束镜 2 变成一束平行光, 平行光经分束器 3 进入扫描光路。反射镜 4 与振镜 5 的空间位置关系见图 2 所示, 平行光经帧扫描反射镜 4 反射到行扫描振镜 5, 完成光线的二维扫描, 进入转换物镜 6, 而后将平行的扫描光聚焦于物镜的象面 7, 并充满物镜 12 的入瞳进入物镜 12, 转换物镜 6 的作用还将返回的荧光象以平行光形式出射, 并将孔阑 11 的象成在行扫描振镜上。光路中附加镜组是原显微分光光度计引出光路用, 在共焦系统中对

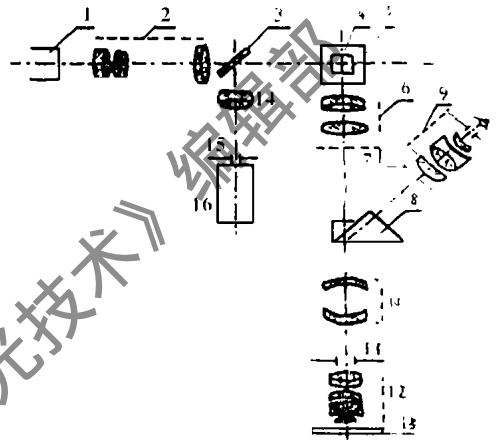


Fig. 1 Scheme of LSCFM optical system

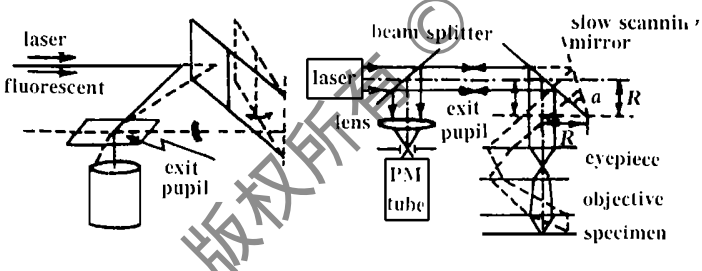


Fig. 2 Schematic diagram for rotating mirror analysis

光路作了改动, 改为从目镜上方引入。设计中, 须考虑该组透镜对后继系统产生的象差及光瞳衔接的影响。

从试样 13 激发出的荧光经物镜成像在物镜的象面上。通过控制和调整转向棱镜 8 的位置, 可使全部或部

分光线返回扫描光路。若采用全部透射式返回的荧光经物镜 6, 进入扫描光路, 在分束器 3 处反射进入集光镜 14, 被针孔 15 及光电倍增管 16 接收。该实验光路的主要参数列于表 1。

Table 1 Main parameters of optical path

optical component	characteristics and parameters
Ar <sup>+</sup> laser, made in Nanjing 772	multiple spectrum output > 25mW, ray diameter 0. 8mm single spectrum output > 12mW, diverging angle 1 mrad
collimating system	$M = 5X, f_{col1}' = 16mm, f_{col2}' = 80mm$
mirror scanning angle	$\alpha = \pm 4. 6$
convert objective lens objective 12	$\Gamma = 6. 3X, F_{cov}' = 40mm, l_{exit}' = 12mm, D_{exit}' = 1\sim 2mm$ $40\times$ objective, $f' = 6. 85mm, NA = 1. 0, 2y = 260\times 260\mu m,$ $100\times$ objective, $f' = 2. 84mm, NA = 1. 25, 2y = 100\times 100\mu m$
collecting lens	$f_{col1}' = 60mm, 40mm$
pinhole	diameter less than airy disc

### 三、设计要点

#### 1. 扫描系统参数的确定及设计

两扫描反射镜放置在光学系统的平行光路中,行扫描反射镜放在系统的出瞳上,帧扫描反射镜放在远离光瞳的地方。两反射镜转角根据被扫描系统的物方视场大小可计算其对应的转角。由于帧扫描反射镜放在远离出瞳的地方,当光线经其反射后会产生渐晕,解决的方法使偏离出瞳的反射镜转轴远离反射镜中心轴线,激光束在出瞳处的偏移量有一个最优值,可用电脑寻优获得最佳光路参数。作法如下:位于出瞳外扫描镜处的实际光路如图 3 所示,激光在出瞳上的横向偏移量为:

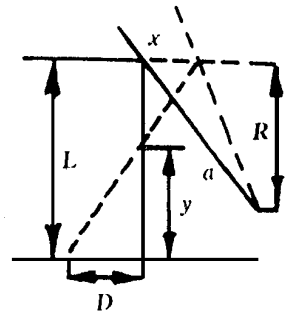


Fig. 3 Schematic diagram for rays reflect on mirror

$$D = y \cdot \text{tg}2\alpha = (L - x/\text{tg}2\alpha) \text{tg}2\alpha \quad (1)$$

式中,  $x = R - R \cdot \text{tg}(45^\circ - \alpha)$  (2)

将(1)式变换得:

$$D = L \cdot \text{tg}2\alpha - R/[1 - \text{tg}(45^\circ - \alpha)]$$

$$= [1 - \text{tg}(45^\circ - \alpha)] \cdot [L/(1 - \text{tg}\alpha) - R]$$

$$= \text{tg}2\alpha(L - R + R \text{tg}\alpha) \quad (3)$$

若  $\alpha$  很小(扫描范围为  $\pm 4.6^\circ$ ), 则  $\text{tg}2\alpha \approx 2\text{tg}\alpha$ , 有  $D = 2(L - R + R \text{tg}\alpha) \text{tg}\alpha$  (4)

将式变换可得:  $D = 2R[\text{tg}\alpha + (L - R)/(2R)]^2 - (L - R)^2/(2R)$  (5)

分析(5)式,当  $L$  和  $R$  相等时  $D$  有极小值,其值为

$$D_{\min} = 2R \text{tg}^2\alpha = 2R(\text{tg}^2 4.6^\circ) = 0.01295R \quad (6)$$

对(3)式进行多变量电脑寻优,可得  $D$  与  $R$  的关系曲线,并可得到当  $R = 36\text{mm}$  时,  $D$  最小,  $D_{\min} = 0.01295R = 0.466\text{mm}$  (7)

除了渐晕外,扫描系统还存在有畸变。如图 4 所示的扫描系统中,  $x$  轴和  $y$  轴反射镜的中心分别为  $a$  点和  $b$  点,两点之间的距离为  $e$ ,  $d$  为  $b$  到输出平面中心的距离,扫描角为  $\alpha_x$ ,  $\alpha_y$ ,象面上任一点的坐标为  $(x_i, y_i)$ , 则  $y_i$  和  $\alpha_y$  之间的关系为:

$$y_i = d \text{tg}\alpha_y \quad (8)$$

$x_i$  的表达式为

$$x_i = (d^2 + y_i^2 + e) \text{tg}\alpha_x \quad (9)$$

将(8)式代入(9)式得:  $x_i = d(1 + e \cos\alpha_y/d)(\text{tg}\alpha_x/\text{tg}\alpha_y)$  (10)

定义误差值为  $\varepsilon$ , 当  $\alpha_y$  从 0 变到某一  $\alpha_y$  时,  $x_i$  的变化与  $\alpha_y = 0$  时  $x_i$  值的比

$$\varepsilon = (x_i - x_{i0})/x_{i0} = (1 - \cos\alpha_y)/[(1 + e/d)\cos\alpha_y] \quad (11)$$

式中,  $\alpha_x$  和  $\alpha_y$  值为  $4.6^\circ$ ,  $e$  为  $36\text{mm}$ 。根据振镜反射镜到物镜象面的距离,  $d$  值为

$$d = 15.6 + 44.8 + 12 = 72.4\text{mm}$$

故  $\varepsilon = (1 - \cos 4.6^\circ)/[(1 + 36/72.4)\cos 4.6^\circ] = 0.0025\text{mm}$

由此可见,  $\varepsilon$  很小,可忽略不计。

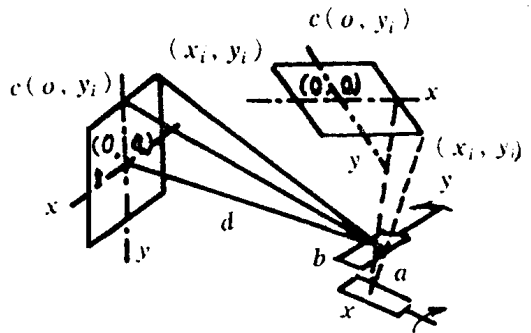


Fig. 4 Diagram for distortion analysis of scanning system

### 2. 成象系统优化设计

为了得到高分辨率光学层析图象, 系统设计中采用高数值孔径的荧光平场复消色差物镜(40<sup>×</sup>/1.0, 100<sup>×</sup>/1.25), 荧光共焦显微镜其纵

Table 3 Longitudinal resolution of confocal microscope

numerical aperture	wave length	
	488nm	550nm
1	0.34 $\mu$ m	0.39 $\mu$ m
1.25(oil)	0.32 $\mu$ m	0.36 $\mu$ m

Table 2 Transverse resolution comparison of confocal and normal microscope

numerical aperture	wave length			
	488nm		550nm	
	normal	confocal	normal	confocal
1	0.35 $\mu$ m	0.21 $\mu$ m	0.34 $\mu$ m	0.24 $\mu$ m
1.25(oil)	0.24 $\mu$ m	0.17 $\mu$ m	0.27 $\mu$ m	0.19 $\mu$ m

横分辨率比普通常规显微镜成象分辨率要高, 见表2和表3。

理想的(直径几乎为0)共焦小孔使系统可获得超分辨率的成象特性。但在实际使用中, 因荧光很微弱, 为了提高被探测的光强, 共焦小孔的直径不能太小, 这将使系统的纵向分辨率降低, 若用环形透镜可提高系统的纵向分辨率。所以对探测形式, 透镜形式进行最佳的匹配是激光扫描共焦荧光显微系统的光学设计要点之一。

共焦小孔直径一般可限制在艾里斑内, 根据系统的总放大率  $M_{总}$  进行计算:

$$M_{总} = M_{物} \times M_{转换物镜} \times M_{管} \tag{12}$$

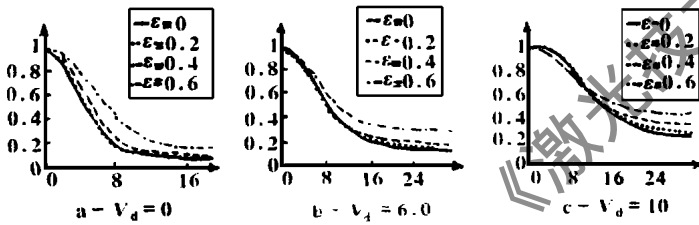


Fig. 5 Normalized axial intensity response for point and area detector respectively

在本系统设计中, 为便于调试,  $M_{管}$  分别设计为1倍和1.5倍, 物镜采用40<sup>×</sup>和100<sup>×</sup>, 对应40<sup>×</sup>物镜, 共焦小孔直径各为17 $\mu$ m和26 $\mu$ m, 对于100<sup>×</sup>物镜, 共焦小孔直径各为34 $\mu$ m和51 $\mu$ m。

采用三维传递函数的计算公式<sup>[3,4]</sup>, 编程计算归一化的三维OTF, 获得点探测器归一化的纵向光强响应曲线如图5所示。图中  $\epsilon$  为光瞳的内外径之比(内径不透光)。  $V_d$  为光学半径(探测器的大小), 其单位为光学单位, 即是以波长为单位, 并综合考虑数值孔径的影响后对几何坐标的一种转换形式。

由图可见: (1) 将  $V_d = 0.0$  的理想系统和  $V_d = 6.0$ , 或  $V_d = 10.0$  的非优化系统 ( $\epsilon = 0$ ) 相比, 可见随探测器半径的增加, 纵向分辨率下降。(2) 同一探测器的共焦系统中, 用环形透镜, 选择最佳  $\epsilon$  值, 可获得比使用圆形透镜更高的纵向分辨率。(3) 计算多组组合可获得有一定大小的圆探测器和环形透镜的最佳组合, 当  $V_d = 6.0$ ,  $\epsilon = 0.4$ , 及  $V_d = 10.0$ ,  $\epsilon = 0.5$  可应用于实际系统中。

分析表明, 在激光扫描共焦荧光显微系统中应使用一定大小的探测器和环形透镜, 可提高探测器的效率, 并获得高质量的层析图象。

激光扫描共焦荧光显微系统是一个涉及光学、精密机械、扫描、数据采集、计算机技术、图象处理等诸多领域的一个复杂系统。为了能够在较短的时间内建立起一个初级实验系统, 我们在对实现该系统的基本方案、关键技术、设计要点、系统特点等进行比较详细探讨的基础上, 解决了系统实现过程中的多个关键技术。以XQF显微分光光度计的主机为机型, 用本文所提出的方案建立一套扫描共焦荧光显微成象系统。

### 参 考 文 献

# 新型质子交换扩钛波导 TM 模偏振器特性分析

冯 莹 季家蓉

(国防科技大学应用物理系,长沙,410073)

摘要: 提出将质子交换区域做在扩钛  $\text{LiNbO}_3$  光波导两侧邻近区域来获得 TM 模光波导偏振器的方案。用二维 BPM 分析计算了质子交换区域的长度、宽度等参数对器件消光比的影响,给出了数值分析结果,并得到了偏振消光比优于 51dB 的实验结果。

关键词: 光波导偏振器 质子交换 偏振消光比

## Analysis of characteristic for proton exchange Ti: $\text{LiNbO}_3$ TM-pass polarizers

Feng Ying, Ji Jiarong

(National University of Defense Technology, Changsha, 410073)

**Abstract:** A novel method to fabricate TM-pass polarizers — introducing proton exchange regions adjacent to Ti:  $\text{LiNbO}_3$  waveguide — has been presented. A two dimension BMP has been used to obtain the characteristics of the TM-pass polarizer, which depend on the length, width and gap of the proton exchange region. The results of the design calculation were given. The extinction factor of 51dB was realized for TM-pass polarizers.

**Key words:** waveguide polarizer proton exchange polarized extinction

### 引 言

集成光波导偏振器是光纤传感器及光通信系统中重要的单元器件之一,如何获得高性能的波导偏振器,是人们关注的一个问题。在扩钛  $\text{LiNbO}_3$  波导上加以质子交换,是制作集成光波导偏振器的方案之一,这种方法是在不连续的单模扩钛  $\text{LiNbO}_3$  波导中间嵌入一段质子交换波导<sup>[1]</sup>,由于质子交换波导段的  $\Delta n_e > 0$ ,  $\Delta n_o < 0$ ,当光从扩钛波导段传输至质子交换波导段时,原扩钛波导中激发的两种模式(TE 模和 TM 模)只有一种能在波导中继续传播,另一种则辐射至波导周围区域,从而在波导中形成了单一的偏振光传输。但这种方案工艺相对复杂,

2 Gu M. Sheppard C J R, Journal of Modern Optics, 1991; 38(11)

3 王翠英,吴震,张平 *et al.* 应用光学, 1994; 16(4): 7~ 11

4 Wu Z, Zhang P, Wang C Y. SPIE Proc, 1993; 1889: 39

\* \* \*

作者简介: 张平,女,1946年出生。副教授。现主要从事光电系统设计和信息处理技术研究。

吴震,男,1943年出生。教授。现主要从事光电信息技术及网络,光电通信和图象处理技术的研究。

向际鹰,男,1972年出生。硕士,现为物理电子和光电子专业博士研究生。主要从事三维超分辨率显微成像技术的研究。