

文章编号: 1001-3806(2005)05-0552-03

高斯光束荧光共焦显微镜的三维光学传递函数

杨初平

(华南农业大学 理学院, 广州 510642)

摘要: 研究高斯光源的束斑半径、光源孔径和探测器孔径对荧光共焦显微镜 3-D OTF 的影响, 获得了具有有限光源孔径、探测器孔径和束斑半径的荧光共焦显微镜的三维光学传递函数 (3-D OTF)。数值计算结果表明, 束斑半径影响到光源孔径和探测器孔径的选择, 与采用平行光比较, 采用小束斑半径的高斯光束可以提高光源孔径和探测器孔径, 获得更好的分辨率和更高的信噪比。

关键词: 信息光学; 荧光共焦显微镜; 高斯光束; 束斑半径

中图分类号: O438 文献标识码: A

The optical transfer function of a fluorescent confocal microscope with extended Gaussian source

Yang Chu-ping

(College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract The influence of the three parameters, namely the beam size of Gaussian source, the source size and the detector size, on the three-dimensional optical transfer function (3-D OTF) of an incident light fluorescent confocal microscope is investigated, and the 3-D OTF of such a set-up is derived. The calculated results show that the beam size has an effect on choosing both the source size and the detector size by means of a gaussian beam with the smaller beam size, both the source size and the detector size can be increased, and better optical resolution and higher signal/noise ratio can be reached, compared with those by means of a parallel beam.

Key words information optics; fluorescent confocal microscopy; Gaussian beam; beam size

引 言

共焦扫描显微镜一经提出, 就受到人们的关注。近十多年来, 其理论研究和应用研究都取得很大进展^[1~11], GU^[12]对此方面作了系统研究, 但大多数只研究平行光、点源和点探测器情况。共焦显微镜与普通光学显微镜相比具有极其明显的优点: 能对物体的不同层面进行逐层扫描, 从而获得大量的物体断层图像, 可以利用计算机进行图像处理; 具有较高的横向分辨率和纵向分辨率; 对于透明和半透明物体, 可以得到其内部的结构图像。光源孔径和探测器孔径是影响分辨率的重要因素, 理论研究方面, 在平行光照射下, 得出满足共焦条件的荧光共焦显微镜^[13]、相干共焦显微镜^[14]的光源孔径为 $R_s \leq 3.83$ 探测器孔径为 $R_d \leq 3.83$ 对共焦显微镜, 多采用高斯激光光源, 文献 [15]

中只得出束斑半径 $\sqrt{w} = 1$ 时, 相干共焦显微镜的光源孔径和探测器孔径可分别达到 $R_s = 4.5$, $R_d = 4.5$ 。作者研究高斯光源的束斑半径、光源孔径和探测器孔径对荧光共焦显微镜三维光学传递函数 (3-D OTF) 的影响, 获得了具有有限光源孔径、探测器孔径和束斑半径时的荧光共焦显微镜的 3-D OTF。计算结果显示: 探测器孔径一定, 光源孔径的增大对 3-D OTF 影响随束斑孔径增大而增大、减小而减小; 无论束斑半径大小, 探测器孔径较光源孔径对 3-D OTF 影响明显; 若 $w = 1$, $R_d = 1$, 则 $R_s = 1.0$ 。因此, 与平行光束比较, 一定的光源和探测器孔径, 采用高斯光束可获得更好的分辨率并提高信噪比。

1 荧光功率传输函数

荧光共焦显微镜的原理如图 1 所示, 从这个系统出发导出一定光源孔径、探测器孔径和束斑半径为 \sqrt{w} 的高斯光束的荧光共焦显微镜的功率传输函数。

假设成像系统的光源和探测器响应函数都是平面函数, 且分别为:

$$S(u_s) = S(u_s, u_y; u_s) = S_1(u_s, u_y) \delta(u_s) \quad (1)$$

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (010297)

作者简介: 杨初平 (1970), 男, 硕士, 从事光电技术方面的教学与研究。

Email: yangchp@sina.com

收稿日期: 2004-08-09; 收到修改稿日期: 2004-12-15

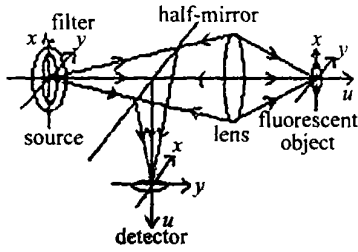


Fig 1 Confocal microscope

式中,

$$S_1(u_x, u_y) = \begin{cases} \exp[-(u_x^2 + u_y^2)/hw^2], & u_x^2 + u_y^2 \leq R_s^2 \\ 0 & \text{其余} \end{cases} \quad (2)$$

$$D(u_i) = D(u_{ix}, u_{iy}; u_d) = D_1(u_{ix}, u_{iy}) \delta(u_d) \quad (3)$$

式中,

$$D_1(u_{ix}, u_{iy}) = \begin{cases} 1, & u_{ix}^2 + u_{iy}^2 \leq R_d^2 \\ 0 & \text{其余} \end{cases} \quad (4)$$

R_s, R_d 分别表示光源半径和探测器半径 (以光学坐标为单位)。 (1) 式和 (3) 式中, u_s, u_i 分别为描述光源和探测器函数的光学坐标矢量。采用文献 [11] 中的坐标变换关系和面光源、面探测器条件下的探测面上接收的荧光强度公式:

$$I(u_p) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \left| \iint_{-\infty}^{\infty} S(u_s) h(u - u_s) du_s \right|^2 \cdot \iint_{-\infty}^{\infty} h(u - u_i) |D(u_i)|^2 du_i \int O(u_p - u) du = \{ |S(u) \otimes_3 h(u)|^2 \cdot [|h(u)|^2 \otimes_3 D(u)] \} \otimes_3 O(u_p) \quad (5)$$

可得图 1 所示的单光子成像系统的三维脉冲响应函数为:

$$F(u) = \{ |S(u) \otimes_3 h(u)|^2 \cdot [|h(u)|^2 \otimes_3 D(u)] \} \quad (6)$$

2 高斯光束荧光共焦显微镜的三维光学传递函数

光学成像系统的成像特性可以由该系统的光学传递函数给出完整描述, 因此, 导出有限光源孔径、探测器孔径和束斑半径的高斯光束荧光共焦显微镜的三维光学传递函数是很有意义的。

对 (6) 式作三维傅里叶变换, 即可得到单光子共焦显微镜的三维光学传递函数:

$$H(\tilde{v}_x, \tilde{v}_y; \tilde{\mu}) = \mathcal{F}_3 \{ |S(u) \otimes_3 h(u)|^2 \times [|h(u)|^2 \otimes_3 D(u)] \} = \mathcal{F}_3 \{ |S(u) \otimes_3 h(u)|^2 \} \otimes_3 \mathcal{F}_3 \{ |h(u)|^2 \} \times \mathcal{F}_2 \{ D(u) \} \quad (7)$$

引用非相干成像脉冲响应函数的傅里叶变换:

$$\mathcal{F}_3 \{ |h(u)|^2 \} = \frac{1}{\tilde{v}} \left[1 - \left(\frac{|\tilde{\mu}|}{\tilde{v}} + \frac{\tilde{v}}{2} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (8)$$

探测器光强响应函数的傅里叶变换为:

$$\mathcal{F}_2 \{ D(u) \} = R_d \frac{J_1(\tilde{\nu} R_d)}{\tilde{\nu}} \quad (9)$$

采用坐标变换 $(u, v) = (u \cos \phi_1, u \sin \phi_1)$; $(u_s, u_y) = (\rho_s \cos \phi_2, \rho_s \sin \phi_2)$, $(\xi, \eta) = (\rho \cos \theta, \rho \sin \theta)$, $\xi = x/a, \eta = y/a$ 为归一化直角坐标, a 为光瞳半径。可得:

$$\Omega(\tilde{v}_x, \tilde{v}_y; \tilde{\mu}) = \mathcal{F}_3 \{ |S(u) \otimes_3 h(u)|^2 \} = \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \times \int_{|\tilde{\mu}|/2}^{|\tilde{\mu}|/2 + \tilde{\nu}} J_0(\rho_s^2(\rho^2 - 2|\tilde{\mu}|)^{1/2}) J_0(\rho_s \rho) \times \left\{ \int_0^{\tilde{\nu}} J_0(\rho^2 - 2|\tilde{\mu}|)^{1/2} J_0(\rho \tilde{\nu}) J_0(\tilde{\nu} \tilde{\nu}) \rho d\rho \right\} \rho d\rho \quad (10)$$

式中, $(\tilde{v}_x, \tilde{v}_y) = (\tilde{\nu} \cos \phi, \tilde{\nu} \sin \phi)$ 。

由于

$$\int_0^{\tilde{\nu}} J_0(\rho^2 - 2|\tilde{\mu}|)^{1/2} J_0(\rho \tilde{\nu}) J_0(\tilde{\nu} \tilde{\nu}) \rho d\rho = \frac{1}{\pi^{1/2} |\tilde{\nu}|} [\rho^2 - (\tilde{\nu}/2 + |\tilde{\mu}|/\tilde{\nu})^2]^{1/2} \quad (11)$$

采用坐标变换 $x^2 = \rho^2 - (\tilde{\nu}/2 + |\tilde{\mu}|/\tilde{\nu})^2$, 可得:

$$\Omega(\tilde{v}_x, \tilde{v}_y; \tilde{\mu}) = \frac{1}{|\tilde{\nu}|} \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \int_0^{(\tilde{\nu}/2 + |\tilde{\mu}|/\tilde{\nu})^{1/2}} J_0(\rho_s^2 \times [x^2 + (\tilde{\nu}/2 - |\tilde{\mu}|/\tilde{\nu})^2]^{1/2}) \times J_0(\rho_s [x^2 + (\tilde{\nu}/2 + |\tilde{\mu}|/\tilde{\nu})^2]^{1/2}) dx \quad (12)$$

最后, 高斯光束荧光共焦显微镜系统的光学传递函数为:

$$H(\tilde{v}_x, \tilde{v}_y; \tilde{\mu}) = \iiint \rho_l \frac{(hR_d)^2}{l_1^2} \left[1 - \left(\frac{l_1}{2} + \frac{|\tilde{\mu} - \tilde{m}|}{l_1} \right)^2 \right]^{1/2} \times \Omega(\tilde{n}_x, \tilde{n}_y; \tilde{m}) d\tilde{n}_x d\tilde{n}_y d\tilde{m} \quad (13)$$

式中,

$$\Omega(\tilde{n}_x, \tilde{n}_y; \tilde{m}) = \frac{1}{|l_2|} \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \int_0^R \exp(-\rho_s^2/hw^2) \rho_s d\rho_s \times \int_0^{\beta/2} J_0(\rho_s^2[\rho^2 + \alpha^2]^{1/2}) J_0(\rho_s^2[\rho^2 + \beta^2]^{1/2}) \rho d\rho \quad (14)$$

式中, $l_1 = [(\tilde{v}_x - \tilde{n}_x)^2 + (\tilde{v}_y - \tilde{n}_y)^2]^{1/2}$, $l_2 = (\tilde{n}_x^2 + \tilde{n}_y^2)^{1/2}$, $\alpha = l_2/2 - |\tilde{m}|/l_2$, $\beta = l_2/2 + |\tilde{m}|/l_2$

采用不同的光源孔径、探测器孔径和束斑半径, 对 (13) 式进行数值计算并考虑系统的轴对称性, 结果如图 2 所示。

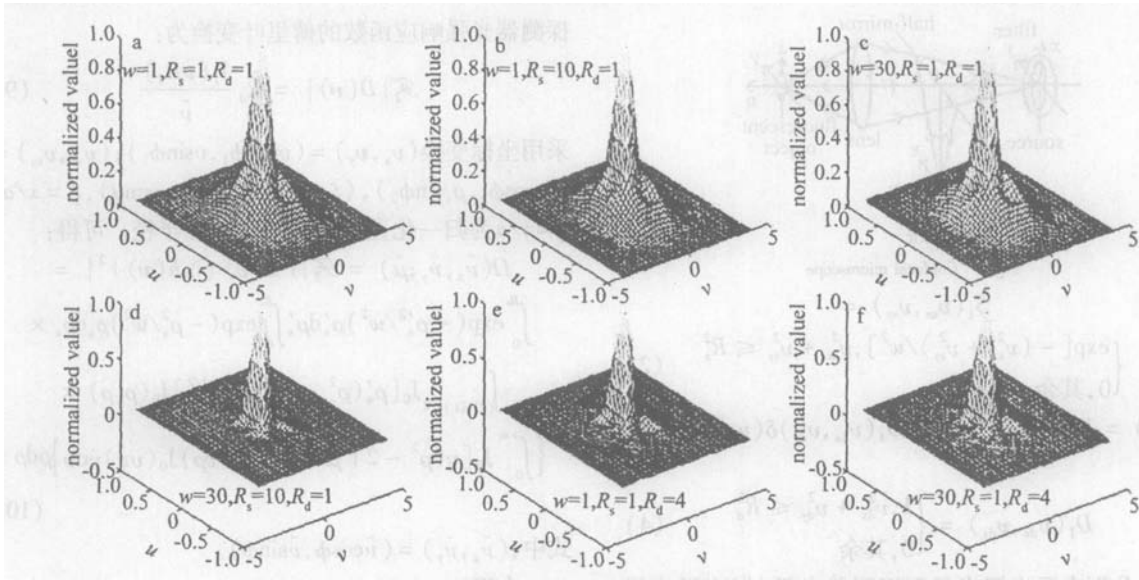


Fig 2 Normalized 3-D OTFs for various ω and R_s, R_d

3 结论

(1) 探测器孔径一定, 光源孔径对系统的 3-D OTF 的影响随束斑半径的增大而增大 (见图 2a 图 2b, 束斑半径 $w = 1, R_s = 1 \sim 10, R_d = 1$, 3-D OTF 形状不变)、减小而减小 (见图 2c 图 2d, $w = 30, R_s = 1 \sim 10, R_d = 1$, 3-D OTF 形状产生明显变化)。

(2) 图 2a 图 2e 中, $w = 1, R_s = 1$, 探测器孔径从 $R_d = 1$ 改变为 $R_d = 4$, 3-D OTF 形状发生明显变化; 图 2c 图 2f 中, $w = 30, R_s = 1$, 探测器孔径从 $R_s = 1$ 改变为 $R_d = 4$, 3-D OTF 形状发生明显改变。这显示无论束斑半径大小, 探测器孔径较光源孔径对系统的 3-D OTF 影响明显。

(3) 若 $w = 1, R_d = 1$, 光源孔径可以取 $R_s = 10$ 系统的 3-D OTF 形状不变。

参 考 文 献

[1] 唐志列, 梁瑞生, 朱小松 *et al* 偏振共焦扫描激光显微镜的成像特性研究 [J]. 光学学报, 1999, 19(8): 1118~1122
 [2] HELL S W, BOOTH M, WILMS S Two-photon near and far field fluorescence microscopy with continuous wave excitation [J]. Opt Lett 1998, 23(15): 1238~1240
 [3] CUMSTEM B H, ANANTHAVEL S P, BARLOW S *et al* Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and

microfabrication [J]. Nature, 1999, 398(4): 51~54.

[4] SUN H B, MATSUO S, M, ISAWA H. Three dimensional photonic crystal structures achieved with two-photon-absorption photopolymerization of resin [J]. A P L, 1999, 74(6): 786~788.
 [5] 裴红津, 唐志列, 杨初平 *et al* 荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响 [J]. 光学学报, 2002, 22(10): 1219~1223
 [6] 唐志列, 黄佐华, 梁瑞生 *et al* 共焦显微镜的纵向分辨率及其判据 [J]. 量子电子学报, 2000, 17(3): 199~204.
 [7] 张平, 吴震, 王翠英 *et al* 荧光共焦扫描系统成像特性的优化 [J]. 光学学报, 1997, 17(3): 308~313.
 [8] 唐志列, 杨初平, 裴红津 *et al* 双光子共焦显微镜的三维成像理论与分辨率改善 [J]. 中国科学, 2002, A 32(6): 538~547.
 [9] 李爱民, 陶纯堪, 刘明 *et al* 共焦扫描激光显微镜的研制 [J]. 激光技术, 1994, 18(5): 261~263
 [10] 张平, 向际鹰, 吴震. 共焦扫描激光显微镜的电子控制系统研究 [J]. 激光技术, 1997, 21(5): 284~287.
 [11] 唐志列, 梁瑞生, 常鸿森. 双光子和多光子共焦显微镜的成像理论 [J]. 物理学报, 2000, 49(6): 1076~1080
 [12] GU M. Principles of three dimensional imaging in confocal microscopes [M]. Singapore World Scientific, 1996, 1~10.
 [13] DRAZIC V. Three-dimensional transfer function analysis of a confocal fluorescence microscope with a finite sized source and detector [J]. J Mod Opt 1993, 40(5): 879~887.
 [14] DRAZIC V. Three-dimensional transfer function of coherent confocal microscopes with extended source and detector [J]. J Mod Opt 1992, 39(8): 1777~1790
 [15] 黄菁, 梁瑞生, 司徒达 *et al* 高斯光束共焦扫描激光显微镜的光学传递函数 [J]. 物理学报, 1998, 47(8): 1289~1294

(上接第 537 页)

upconversion mechanisms in high concentration erbium-doped silica waveguides [J]. IEEE J Lightwave Technol 1995, 13(9): 1858~1864.
 [5] Van Den HOVEN G N, SNOEK S E, POLMAN A *et al* Upconversion in Er³⁺ implanted Al₂O₃ waveguides [J]. JA P, 1996, 79(3): 1258~1265
 [6] SHOOSHAR IA, TOUAM T, NAJFIS I *et al* Yb³⁺ sensitized Er³⁺-

doped waveguide amplifiers: a theoretical approach [J]. Opt & Quant Electron 1998, 30(4): 249~264

[7] MAURICE E, MONNOM G, DUSSARDIER B *et al* Clustering effects on double energy transfer in heavily ytterbium-erbium-codoped silica fibers [J]. J O S A, 1996, B13(4): 693~698.
 [8] 柳祝平, 胡丽丽, 戴世勋 *et al* LD 泵浦的 Er³⁺、Yb³⁺ 共掺磷酸盐钕玻璃激光性质 [J]. 发光学报, 2002, 23(3): 238~242