

共焦扫描成像研究^{*}

杨莉松 王桂英 王建岗 徐至展

(中国科学院上海光机所强光光学开放研究实验室 上海 201800)

提要 在建立的一套反射式光纤共焦扫描成像系统上进行了标准板的扫描成像实验及反色、拼接等图像处理,得到了二维扫描像,并进行了二维共焦扫描像及离焦像的比较。实验结果表明,系统具有亚微米级横向分辨能力,并具有微米级纵向层析能力。

关键词 反射式光纤共焦扫描成像,系统分辨率,离焦像,图像处理

1 引言

M. Minsky 等在 50 年代提出了共焦扫描成像的思想^[1]。共焦扫描显微术发展至今已在材料、生物医学领域得到了广泛的研究及应用^[2~6]。其最大优越性在于系统可以抑制微弱杂散光对成像的影响,从而获得比常规显微系统高的反衬度;另外系统对透明、半透明物体具有一定的深度层析能力,因此目前受到了生物医学成像界的普遍关注。

将光纤器件用于共焦扫描成像系统,使得系统结构紧凑、小型化、抗干扰性强,是共焦显微术的发展方向之一。了解系统成像特性、进行系统优化设计是把光纤共焦扫描显微术推向实用化、商品化的关键。为此,我们尝试用一个单模光纤耦合器实现常规共焦光路中的点光源一点接收,建立了一套小型且易调节的反射式光纤共焦扫描显微系统,并分析了影响该系统成像分辨率的因素^[7]。本文在此基础上选择了合适参数的透镜,进行了扫描数据的采集及图像重构,获得了鉴别率板的二维共焦扫描像;还进行了二维共焦扫描像及离焦像的比较,结果表明系统具有微米级纵向层析能力,这将是进行共焦扫描像三维重构的基础。

2 实验装置

反射式光纤共焦成像系统实验装置如图 1 所示。632.8 nm He-Ne 激光(功率 >7 mW),经透镜 L_1 耦合至单模光纤耦合器(分光比为 50/50; 0.15N. A.; 场模半径为 2.1 μm)的孔 1 (port1)。通过调节 L_1 -光纤的耦合,可以控制系统光源强度。经孔 3 输出的光束分别经透镜 L_2 和 L_3 聚焦在样品上。从样品表面反射的光按原路返回至孔 3,即孔 3 同时起着照明点光源和接收小孔光阑的作用。孔 4 输出样品反射的信号光到 CCD(信噪比 >48 dB,最小照度为 0.02Lx)。微机通过压电陶瓷驱动器(PZT driver)控制三维 PZT 平台的移动(程长为 20.0 μm ,

^{*} 国家自然科学基金重点基金(项目批准号 69637030)及王宽成基金资助项目。

收稿日期: 1998-04-24; 收到修改稿日期: 1998-06-02

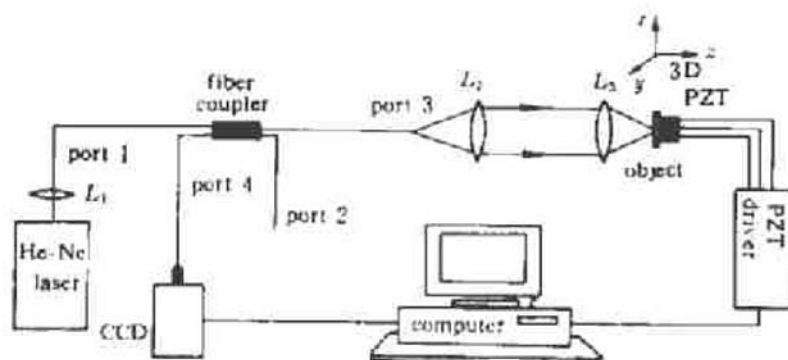


图 1 反射式光纤共焦扫描显微成像系统实验装置

Fig. 1 Experimental setup of confocal reflection-mode scanning microscope using a single-mode fiber coupler

精度为 5 nm), 并同步地对 CCD 采集到的共焦点的灰度数据进行记录, 最后重构出图像。

反射式光纤共焦扫描显微系统中, 光纤-集光透镜参数 A 和物透镜数值孔径是影响系统分辨率的重要参数。其中

$$A = (2\pi a_0 r_0 / \lambda d_1)^2 \quad (1)$$

r_0 为光纤模场半径, a_0/d_1 为集光透镜有效数值孔径。

一般地, 系统横向分辨率 r_t 和纵向分辨率 r_s 可分别表示为^[7,8]

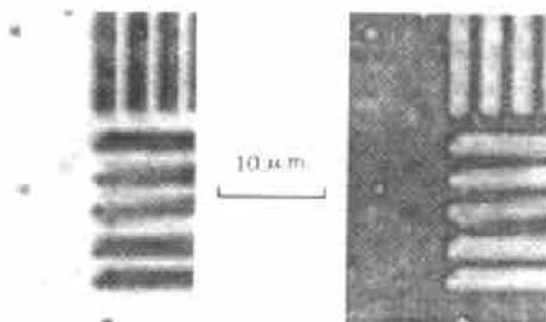
$$r_t = \frac{\lambda \sqrt{A\pi}}{2\pi n \sin\alpha} \quad (2)$$

$$r_s = \frac{2 \cdot n\lambda A}{8\pi (n \sin\alpha / 2)^2} \quad (3)$$

式中, $n \sin\alpha$ 为物空间有效数值孔径。

由上式可知, A 值越小、物透镜有效数值孔径越大将越有利于提高系统的成像分辨率。一般是通过减小光纤数值孔径及加大物透镜数值孔径的方法提高系统成像分辨率。在我们的实验条件下, 光纤参数一定, 且考虑到工作距离及像差因素, 物透镜的数值孔径不宜过大。因此, 为了提高系统成像分辨率, 我们选择了数值孔径比光纤数值孔径小的集光透镜。这种方法的主要问题是集光透镜-光纤耦合时存在能量损失。对于进行的鉴别率板成像实验, 所用的激光源

功率足够大, 可以不考虑能量损失问题。因此 L_2 选用了 4× 的物镜 (0.10 N. A.), L_3 选用了 40× 物镜 (0.65 N. A.)。在理论上, 系统横向分辨率为 0.55 μm (实测 0.6 μm^[7]); 纵向分辨率为 1.9 μm (实测 2.5 μm^[7])。



19 μm × 19 μm

图 2 标准板二维共焦扫描像

(a) 底片像, (b) 实物像

Fig. 2 The 2D image of standard bars

(a) original; (b) color-inverted

3 成像实验及分析

3.1 二维共焦扫描像

图 2 为标准鉴别率板的二维共焦扫描像。为提高对比度, 进行了图像的归一化处理。此外, 由于系统接收的是由物体表面发出的反射光, 获得的像为“底片”效果。即黑条纹为反射率低的玻璃

面,白底为反射率高的镀膜层。因此我们对原图像进行了反色处理,成为实物像。另外,实验中使用的移动平台最大可以移动 $20.0 \mu\text{m}$,我们采用了图像拼接技术,获得了大于 $20.0 \mu\text{m}$ 尺度的图像,拓展了共焦扫描系统的成像范围。从图中可以较清晰地分辨出反射膜层上的亚微米瑕疵。对该位置进行过重复测量,成像稳定性较好。

3.2 二维扫描离焦像

在光源强度、扫描位置保持不变情况下,对鉴别率板进行了离焦 $2.5 \mu\text{m}$ 的成像实验,并将其与不离焦的扫描像进行了比较,如图 3 所示。比较未经归一化处理的 (a), (b) 两幅原图,很明显,相同光源强度下离焦像信号较弱。另外,比较进行图像处理后的 (c), (d) 图,可以看出离焦像的对比度不如未离焦时的扫描像。可见共焦扫描成像系统对离焦背景有较好的滤除作用。这正是系统可以进行三维成像的前提。

3.3 二维共焦扫描像的图像分析

上述实验中,由于在鉴别率板表面,玻璃和膜层的反射率明显不同,得到了有较大对比度的扫描像。但我们同时注意到,相同介质不同区域的像也存在灰度变化。如图 4 所示的实物像,可以较明显地看到玻璃表面有“纹理”。分析这种纹理的来源:一种可能是玻璃平整,但表面存在细微反射率变化从而产生有灰度变化的像;另一种

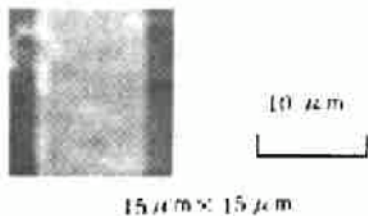


图 4 物体表面纹理像

Fig. 4 The surface image of the object

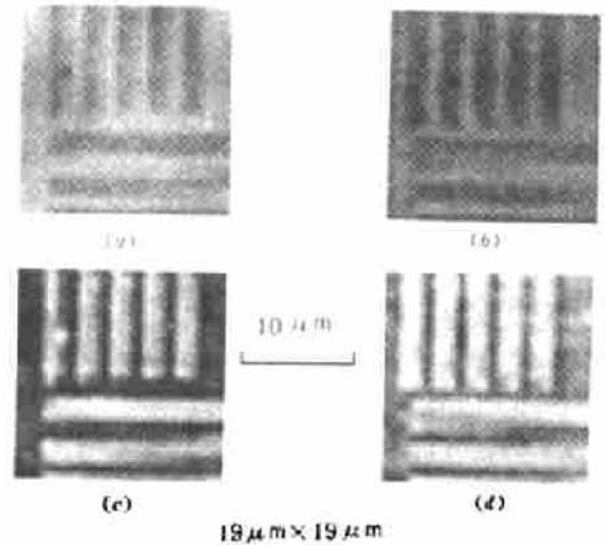


图 3 共聚焦 (a), (c) 与离聚焦 (b), (d) 的比较

(a), (b) 底片像,未归一化; (c), (d) 反色,归一化

Fig. 3 Comparison between the in-focus (a), (c) and de-focus (b), (d) images

(a), (b) original; (c), (d) normalized and color-inverted

可能是玻璃表面的反射率均匀为常量,而由于表面不平整以及共焦扫描系统的三维成像特性使得扫描像产生表面纹理效果;还有较大可能是既存在表面不平整度,又存在反射率的细微变化

而出现纹理现象。由于存在以上的可能,很难通过二维共焦扫描像确切解释物体微结构信息。我们认为只有通过某一确定成像区进行多层面的扫描,才能够从图像中获得较真实的物体信息。原理如下:如果所得各幅像的纹理分布具有相似性,则可以认为纹理反映的是平整物体表面的反射率信息;而大多情况下各幅像的纹理分布将不具有相似性,此时图像反映了表面的不平整度(为系统可分辨量),或更多可能是包含了物体的光学

(反射率等)和形貌(三维结构)的双重信息。只有通过分析成像面之间相互影响的基础上进行三维图像重构能够将叠加信息在一定程度上分离,获得物体的像。这是现有共焦扫描三维成像技术中的难点和关键,也是我们进一步工作的方向之一。

致谢 中国科学院上海光机所黄惠杰老师为我们提供了实验中用的鉴别率板,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 M. Minsky. Microscopy Apparatus. U. S. Patent 3013467, Dec, 19, 1961
- 2 C. J. R. Sheppard, T. Wilson. Depth of field in the scanning microscope. *Opt. Lett.*, 1978, 3(3):115~117
- 3 T. Wilson, C. J. R. Sheppard. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. London; Academic, 1984. 1~20
- 4 C. J. R. Sheppard. Scanning Optical Microscopy, in advances in Optical and Electron Microscopy (Vol. 10), London; Academic, 1987. 1~98
- 5 T. Wilson. Confocal Microscopy. London; Academic, 1990. 1~50
- 6 J. B. Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York; Plenum, 1994. 1~20
- 7 Yang Lisong, Wang Guiying, Wang Jiangang *et al.*. Reflection-mode fiber-optical confocal scanning system. *Acta Optica Sinica* (光学学报), 1999, 19(7):962~967 (in Chinese)
- 8 Min. Gu. Principles of Three-dimensional Imaging in Confocal Microscopes. London; World Scientific, 1996. 175~210

Research on Confocal Scanning Imaging

Yang Lisong Wang Guiying Wang Jiangang Xu Zhizhan

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract Optical serial sectioning based on the depth-discriminating ability of a fiber optical confocal scanning microscope (FOCSM) can be combined with digital image processing to realize 3D microscopy. An instrument of FOCSM was designed for this purpose. In this paper, the 2D images of standard bars with some kinds of image processing in the FOCSM was shown. Furthermore, the in-focus image with the de-focus image has been compared, and the 2D images for the further 3D reconstruction are analyzed.

Key words fiber optical confocal scanning imaging in reflection mode, system resolution, de-focus image, image processing