

# 变迹术对改善共焦系统分辨率的实验研究\*

步 扬 王桂英 杨莉松 王建岗 徐至展

(中国科学院上海光机所 上海 201800)

**提要** 给出了在反射式光纤共焦扫描成像系统中,利用变迹术提高系统分辨率的原理,并做了相应的对比实验.在加入变迹掩模后,系统对物体的成像响应曲线、物体直边边缘展宽量都有所改善.实验数据证明,改变光瞳函数可以提高系统的横向分辨率,同时不降低系统的纵向分辨率.

**关键词** 变迹术,共焦扫描,超分辨,光瞳函数

## 1 引 言

自从 Minsky 在 50 年代提出了共焦扫描成像的原理之后, Walker, Sheppard 和 Wilson 等对共焦系统做了进一步的研究<sup>[1-10]</sup>.理论和实验表明:在相同成像条件(波长和数值孔径)下,由于共焦扫描显微系统特殊的光学性质,使其横向分辨率要比传统的显微系统高 1.4~2 倍,达到亚微米级;而且还有微米级纵向层析能力.目前,共焦扫描显微术已成为材料、生物医学等领域中重要的检测技术.但是,普通共焦显微镜的横向分辨率只能达到亚微米的数量级,而生物体细胞内部组织结构的尺寸一般小于  $0.1\ \mu\text{m}$ .因此,有必要采用新的技术来提高共焦系统的分辨能力.目前,一般采用两类方法:(1)改变测量技术,如采用干涉术<sup>[8]</sup>、差分术<sup>[9]</sup>等;(2)改变普通共焦显微镜的结构,例如:利用探测器阵列取代普通的小孔和探测器<sup>[5]</sup>,或者在系统中加入变迹掩模<sup>[2-7]</sup>.本文着重讨论了在共焦扫描成像系统中加入变迹掩模后对分辨率的影响,并做了对比实验,获得了系统的纵向响应曲线和直边物体的展宽曲线,并进行了二维成像实验.结果表明加入变迹掩模,可以提高系统的横向分辨率,同时不降低系统的纵向分辨率,从而为生物组织和材料的三维检测提供了一种新的手段.

## 2 实验装置

实验中使用的是反射式光纤共焦扫描显微系统,实验结构如图 1 所示.其基本原理为:He-Ne 激光( $632.8\ \text{nm}$ , TEM<sub>00</sub>模)经透镜耦合至保偏单模光纤耦合器(分光比:50/50,光纤有效数值孔径 0.13,场模半径  $2.4\ \mu\text{m}$ ).耦合器输出端 3(Port 3)与  $4\times$ 集光透镜  $L_2$  及  $40\times$ 物镜  $L_3$  组成反射式共焦光路.输出端 2(Port 2)浸入折射率与光纤匹配的甘油溶液中,以避免光纤端面反射引起的干扰.微机通过压电陶瓷驱动源控制三维压电陶瓷平台(最大程长  $20.00\ \mu\text{m}$ ,

\* 国家自然科学基金(No. 69777004 和 No. 69637030)资助课题.

收稿日期: 1999-04-12; 收到修改稿日期: 1999-08-30

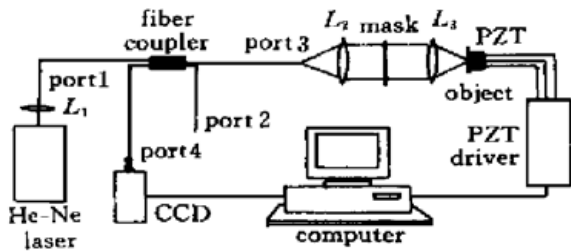


图 1 加上掩模之后的反射式共焦扫描显微镜实验装置图

Fig. 1 Experimental setup of reflection-mode confocal scanning microscopy with a apodized pupil mask

定位精度 < 5 nm) 移动, 实现对样品的扫描. 同时, 微机也对探测器 CCD(信噪比 > 48 dB, 最小照度 0.02 lx) 采集到的扫描点灰度量进行处理, 最后重构出样品的像. 透镜组  $L_2, L_3$  相当于反射式共焦扫描成像系统中的等效透镜, 而输出端 3 (Port3) 则同时起着共焦系统中照明点光源和接收小孔光阑的作用. 当采用变迹术时, 变迹掩模 (Mask) 置于透镜  $L_2, L_3$  之间, 从而组成共焦变迹成像系统.

### 3 成像实验和分析

根据变迹理论<sup>[1, 2, 11, 12]</sup>, 只要适当地改变系统的光瞳函数, 就可以改变系统的分辨率. 在图 1 所示的实验装置中, 只要选择合适的变迹掩模, 就可以改变光瞳函数, 从而改变系统的分辨率. 基于此, 我们设计了可以提高系统分辨率的掩模<sup>[13]</sup>, 并做了实验.

#### 3.1 系统横向响应实验

横向响应曲线反映了系统对二维平面细节的分辨能力. 为了在实验中直观地显示系统横向分辨率的改变, 本文采用系统对直边物体边缘的展宽响应作为测试基准<sup>[3, 5]</sup>. 同时, 为了显示变迹光瞳函数的分辨特性, 采用边缘处 ( $x = 0$ ) 强度的梯度大小作为判别依据. 图 2 为在相同条件下分别对无掩模系统和有掩模系统所做的直边物体的二维扫描实验. 图 3 给出了图 2 所成像的直边响应曲线.

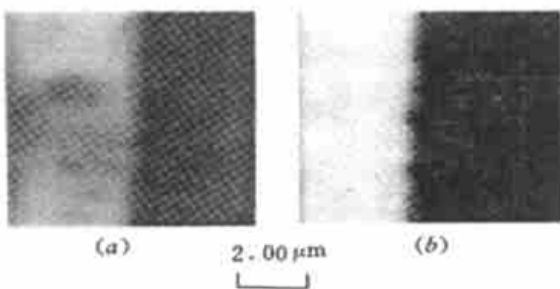


图 2 直边物体的二维扫描成像  
(a) 无掩模系统的直边物体所成图像;  
(b) 加上掩模之后的系统对直边物体所成图像

Fig. 2 Response images to straight edge object of  
(a) the system without an apodized film;  
(b) the system with an apodized film

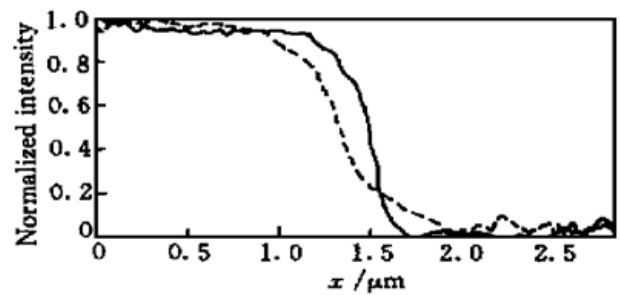


图 3 直边物体的横向响应曲线  
实线为加上掩模之后的直边物体响应曲线,  
虚线为无掩模系统的直边物体响应曲线

Fig. 3 Response curve to a straight edge object  
The dash line is the curve without an apodized film,  
the solid curve is the curve with an apodized film

图 2 显示出由于掩模的使用, 改变了系统的点振幅响应函数, 系统对直边物体的成像就发生了变化. 未加掩模时, 图像(图 2 (a)) 比较灰暗, 而且边缘模糊, 边缘细节不能分辨. 加上掩模之后, 由于掩模的作用, 使得视场的光照度有所增强, 图像(图 2 (b)) 变得比较明亮. 更主要的是此时的分辨率也有所提高, 从图 2 (b) 可以看到此时边缘已经变得清楚, 边缘的细节很明显, 已经可以分辨物体表面的起伏. 从图 3 可更清晰地看到这一变化过程. 由于物体边缘的强度始终在远离边缘的物体强度的 1/4 处<sup>[11]</sup>, 反映到图 3 中, 即物体的边缘是在归一化强度的 1/

4 处所对应的横坐标值. 此处的斜率值反映了分辨率的高低. 未加掩模时(图 3 中的虚线), 斜率为 1.07, 加上掩模之后(图 3 中的实线), 斜率为 3.46. 可见, 加上掩模之后, 斜率增加了 3.24 倍, 这表明加上该掩模后, 系统的横向分辨率得到提高. 同时, 由于共焦系统的有效点振幅响应函数为各等效透镜点振幅响应函数的乘积, 因此, 共焦系统能够抑制旁瓣效应. 从图 3 中可以看到, 加上掩模之后, 系统的旁瓣比未加掩模时变得更加平缓. 这就表明, 在提高分辨率的同时, 使用该掩模还能够进一步地抑制旁瓣, 提高系统的成像对比度.

### 3.2 系统纵向响应实验

系统的纵向响应曲线反映了系统对三维物体的轴向层析能力的大小. 轴向响应曲线的半高宽值是这一能力大小的具体数值指标. 将反射镜面垂直于光轴, 置于共焦系统焦点附近, 并沿轴向进行平移, 获得了如图 4 所示的系统纵向强度响应曲线.

系统进行轴向平移时, 纵向响应曲线应该是对称的. 无掩模时, 由于调整技术问题, 系统曲线(图 4 虚线)的对称性并不好, 而加上掩模之后, 系统的对称性得到一定改善. 从图 4 可知, 无掩模系统的归一化强度曲线的半高宽值  $W_0$  为  $2.933 \mu\text{m}$ , 加上掩模之后, 共焦系统的强度曲线的半高宽值  $W_c$  为  $2.452 \mu\text{m}$ . 两者相比, 加上掩模之后, 系统的纵向分辨能力比原先提高了将近  $0.5 \mu\text{m}$ , 纵向分辨率增益  $G$  达到了 19.62%. 这表明加上该掩模之后, 系统在横向分辨率提高的同时, 纵向分辨率也得到了增强, 从而提高了对三维物体的轴向层析能力.

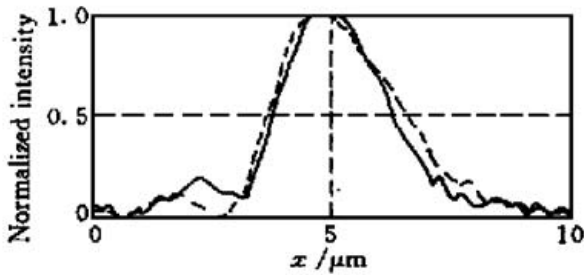


图 4 纵向响应的归一化强度曲线  
虚线为无掩模系统的强度曲线,  
实线为加上变迹掩模系统的强度曲线

Fig. 4 Intensity curve of the axial response to a perfect reflector

The dash line is the curve of the system without an apodized film, the solid line is the curve of the system with an apodized film

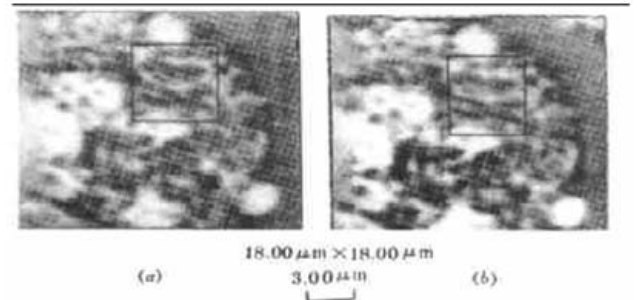


图 5 生物组织的扫描图像  
(a) 无掩模系统所成图像;  
(b) 有掩模系统所成图像

Fig. 5 Biologic tissue image of the system

(a) without an apodized pupil mask;  
(b) with an apodized pupil mask

### 3.3 生物体的实验成像

图 5 给出了这一系统对生物细胞内染色体的成像对比结果. 为了突出细节, 图像已经经过了反色处理.

从图 5 可以看到, 加上掩模之后, 生物体细节的变化已经可以分辨, 特别是从图中画黑框的部分可以明显地看到这一效果. 未加掩模时(图 5(a)), 生物体组织细节之间的过渡不清楚, 容易误认为同一组织. 而加上掩模之后(图 5(b)), 组织之间的过渡和分界变得很清晰, 因而容易分辨出这是生物体内的不同组织部分. 这就说明了利用变迹术可以提高系统的分辨率, 从而增强了对物体细节的鉴别能力.

## 4 结 论

通过上述讨论和实验,可知在相同测试条件(光强、透镜参数等均相同)下,在反射式共焦显微镜中加入变迹掩模,能够提高系统的横向分辨率,同时保证系统的纵向分辨率不会降低,从而提高了对物体的横向分辨能力和轴向层析能力.但是在实验中也发现,加入掩模之后,系统的噪声有所增加,从而降低了信噪比,在一定程度上抑制了分辨率的提高.因此,进一步优化掩模的相关参数,并在处理信号时采用更好的算法,这将是下一步工作的中心.

## 参 考 文 献

- 1 Min Gu. Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes. Singapore: World Scientific, 1996
- 2 Zhihua Ding, Guiying Wang, Min Gu *et al.*. Superresolution with an apodization film in a confocal setup. *Appl. Opt.*, 1997, **36**(1): 360~ 363
- 3 S. J. Hewlett, S. M. Barnett, T. Wilson. Image intensity at the edge of a straight edge object. *J. Modern Opt.*, 1990, **37**(12): 2017~ 2024
- 4 Z. S. Hegedus, V. Sarafis. Superresolving filters in confocally scanned imaging systems. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1986, **3**(11): 1892~ 1896
- 5 T. Wilson, S. J. Hewlett. Superresolution in confocal scanning microscopy. *Opt. Lett.*, 1991, **16**(14): 1062~ 1064
- 6 J. G. Walker, E. R. Pike, R. E. Davies *et al.*. Superresolving scanning optical microscopy using holographic optical processing. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1993, **10**(1): 59~ 64
- 7 J. Grochmalicki, E. R. Pike, J. G. Walker *et al.*. Superresolving masks for incoherent scanning microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1993, **10**(5): 1074~ 1077
- 8 R. Juskaitis, T. Wilson, N. P. Rea. Compact confocal interference microscopy. *Opt. Comm.*, 1994, **109**(1~ 2): 167 ~ 177
- 9 Chau-Hwang Lee, Jyhpyng Wang. Noninterferometric differential confocal microscopy with 2-nm depth resolution. *Opt. Comm.*, 1997, **135**(3, 4, 5): 233~ 247
- 10 C. J. R. Sheppard, T. Wilson. Imaging properties of annular lenses. *Appl. Opt.*, 1979, **18**(22): 3764~ 3769
- 11 W. Goodman. Introduction to Fourier Optics. New York: Mc Graw-Hill, 1968
- 12 M. Born, E. Wolf. Principles of Optics. London: Pergamon, 1975
- 13 Bu Yang, Wang Guiying, Wang Zhijiang *et al.*. An apodization mask based on circle grating function with different space in confocal microscope. *Acta Optica Sinica* (光学学报), 2000, **20**(7): 979~ 983 (in Chinese)

## Improving Confocal Scanning Imaging System Resolution by Using Apodization

Bu Yang Wang Guiying Yang Lisong Wang Jiangang Xu Zhizhan

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

**Abstract** In confocal scanning imaging system, using apodization can improve the system resolution. The paper presents the principles. The experiments are done in a reflection mode fiber confocal scanning microscopy with the mask, the intensity response curves in transverse and axial direction of this system are given. A sharp straight edge of a flat object is measured. The results demonstrate that an apodized mask does not reduce the axial resolution while can improve the transverse resolution.

**Key words** apodization, confocal scanning microscopy, superresolution, pupil function