

# 共焦扫描显微术中影响轴向分辨率的因素分析

丁志华 包正康 刘 昱 包晓晖

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室 杭州 310027)

**提要** 着重分析了共焦扫描术中影响轴向分辨率的各种因素,并给出了初步的实验结果,同时讨论了优化轴向分辨率的可能途径。

**关键词** 轴向分辨率,共焦扫描显微术,针孔尺寸探测器,光瞳函数

## 1 引 言

共焦扫描显微术是 80 年代迅速发展起来的新型成像技术,在生物学、医学等诸多领域有着广泛应用。它能对样品作无损的分层扫描成像,然后三维重建。因此,光学层切性质是共焦扫描显微术的最大优点,提高共焦扫描显微术的轴向分辨率显得尤为重要<sup>[1,2]</sup>。鉴于此,本文将着重分析共焦扫描显微术中影响轴向分辨率的各种因素,并讨论优化轴向分辨率的可能途径。

## 2 探测器状况对轴向分辨率的影响

图 1 为反射式共焦扫描系统的典型构成。假定一强度分布为  $S(x_1, y_1)$  的非相干光通过孔径函数为  $P(\xi_1, \eta_1)$  的显微物镜聚焦到样品上,其振幅反射系数为  $t(x_0 - x_s, y_0 - y_s)$ 。从样品回来的反射光被孔径函数为  $P(\xi_2, \eta_2)$  的集光镜聚焦到非相干探测器上,其强度响应函数为  $D(x_2, y_2)$ 。如果将系统看成为部分相干成像系统,则探测器接收到的光强信号为<sup>[2,3]</sup>

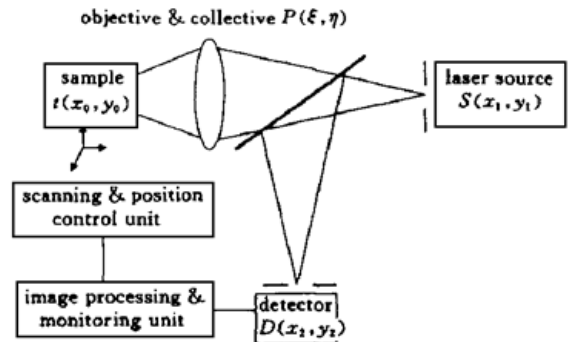


图 1 反射式共焦扫描成像系统典型构成

Fig. 1 Typical setup for reflection-mode confocal scanning microscope

$$I(x_s, y_s) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} C(m, n; p, q) T(m, n) T^*(p, q) \exp 2\pi j \{ (m - p)x_s + (n - q)y_s \} dm dn dp dq \quad (1)$$

式中

$$T(m, n) = \iint_{-\infty}^{+\infty} t(x, y) \exp \{ - 2\pi j (mx + ny) \} dx dy \quad (1a)$$

$$T^*(p, q) = \iint_{-\infty}^{+\infty} t^*(x, y) \exp\{2\pi j(px + qy)\} dx dy \quad (1b)$$

$$C(m, n; p, q) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} F_s \left[ \frac{\xi_2 - \xi_1}{\mathcal{N}}, \frac{\eta_2 - \eta_1}{\mathcal{N}} \right] F_D \left[ p - m - \frac{\xi_2 - \xi_1}{\mathcal{N}}, q - n - \frac{\eta_2 - \eta_1}{\mathcal{N}} \right] \cdot P(\xi_1, \eta_1) P^*(\xi_2, \eta_2) P(\mathcal{N}m - \xi_1, \mathcal{N}n - \eta_1) P^*(\mathcal{N}p - \xi_2, \mathcal{N}q - \eta_2) d\xi_1 d\eta_1 d\xi_2 d\eta_2 \quad (1c)$$

$$F_s(m, n) = \iint_{-\infty}^{+\infty} S(x_1, y_1) \exp\{2\pi j(mx_1 + ny_1)\} dx_1 dy_1 \quad (1d)$$

$$F_D(m, n) = \iint_{-\infty}^{+\infty} D(x_2, y_2) \exp\{2\pi j(mx_2 + ny_2)\} dx_2 dy_2 \quad (1e)$$

这里  $C(m, n; p, q)$  为部分相干传递函数, 它反映空间频率分量  $(m - p, n - q)$  通过成像系统的传输性质。 $\lambda$  为光波长,  $f$  为物镜焦距, 并假定系统为单倍率成像系统。

如果以理想反射体

$$t(x_0, y_0) = 1 \quad (2)$$

作为样品, 并根据轴向响应函数来考察系统的轴向分辨率, 则有

$$I(u) = C(0, 0; 0, 0) = \iiint_{-\infty}^{+\infty} G(\xi_1 - \xi_2, \eta_1 - \eta_2) P^2(\xi_1, \eta_1) P^{*2}(\xi_2, \eta_2) d\xi_1 d\eta_1 d\xi_2 d\eta_2 \quad (3)$$

式中

$$G(\alpha, \beta) = F_s(\alpha, \beta) F_D(\alpha, \beta) \quad (3a)$$

$u$  是轴向归化光学坐标, 其与光瞳函数的关系为

$$P(\rho) = \begin{cases} \exp \frac{1}{2} j u \rho^2 & |\rho| \leq 1 \\ 0 & |\rho| > 1 \end{cases} \quad (3b)$$

与实际沿轴坐标  $z$  的关系为

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2(\alpha/2) \quad (3c)$$

这里  $\sin\alpha$  为物镜的数值孔径。

若引进  $G(\alpha, \beta)$  的傅氏变换形式  $G(v_x, v_y)$ , 则(3)式可改写为

$$I(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} |h(2u, v)|^2 g(v_x, v_y) dv_x dv_y \quad (4)$$

式中

$$g(v_x, v_y) = S(v_x, v_y) \otimes D(v_x, v_y) \quad (4a)$$

$$h(u, v) = \int_{-\infty}^{+\infty} p(\rho) J_0(v\rho) \rho d\rho \quad (4b)$$

其中符号  $\otimes$  代表卷积运算,  $v$  为径向归化光学坐标, 它与实际径向坐标  $r$  的关系为

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} r \sin\alpha \quad (4c)$$

$v_x$  和  $v_y$  为归化光学坐标分量, 它与  $v$  的关系为

$$v^2 = v_x^2 + v_y^2 \quad (4d)$$

至此, 我们可依据(3)式或(4)式来讨论探测器状况对系统轴向分辨率的影响。若采用单元探测器作为信号接收器件, 则由于光源强度分布和探测器响应分布一般都是非负函数,  $g(v_x, v_y)$  因而也必然为非负函数。由(4)式可知, 如果  $g(v_x, v_y)$  为非负, 则点源点探测器情形对应于最大的轴向分辨率; 而当单元探测器尺度增大时, 系统轴向分辨率将下降。若采用面探测器作为信号接收器件, 则情况就大不相同。我们可将不同探测单元的信号作权重叠加, 进而构筑

出所需的响应函数  $D(v_x, v_y)$  和  $g(v_x, v_y)$ , 显然可以允许有负响应。因此, 对于面阵探测器情形, 我们能构筑轴向响应曲线, 使其主瓣宽度小于理想共焦情形的对应宽度。轴向响应曲线的巨大旁瓣也能被设计在样品轴向尺度之外, 从而实现所谓的有限景深轴向超分辨<sup>[4]</sup>。

以下考证单元探测器尺度对系统轴向分辨率的影响。参见图 2 的实验装置, 以反射镜作为样品, 光源采用  $\text{Ar}^+$  激光, 并经光栅单色化处理(图中未示出), 工作波长为 488 nm。单元探测器尺度则通过改变其前的小孔来控制。图 3 展示了不同集光镜数值孔径与小孔尺度条件下的轴向响应曲线。很显然, 轴向响应曲线与小孔归化光学尺度  $v_d$  有关, 其定义为

$$v_d = \frac{2\pi}{\lambda} r_d \sin\alpha_d \quad (5)$$

式中  $r_d$  为小孔半径,  $\sin\alpha_d$  为集光镜的数值孔径。

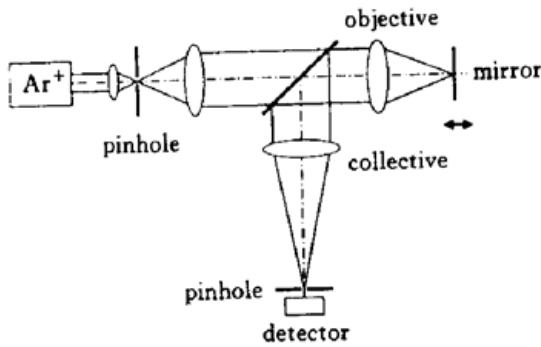


图 2 轴向响应测试实验装置图

Fig. 2 Experimental setup for the measurement of axial response

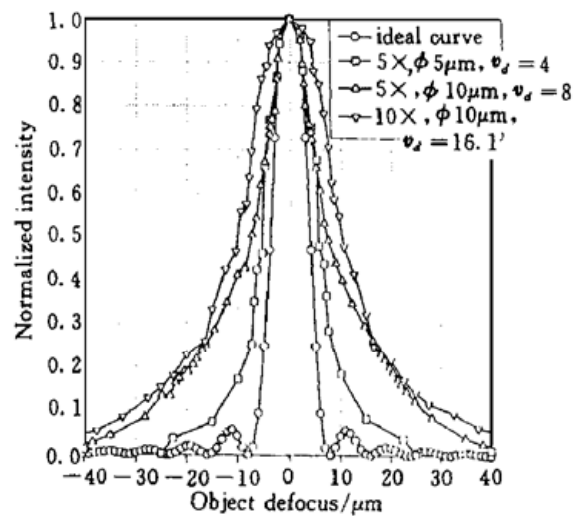


图 3 单元探测器归一化光学尺度  $v_d$  对轴向响应曲线的影响

Fig. 3 The experimental axial responses for different normalized radius of pinholes  $v_d$

实验中, 实际小孔的归化光学尺度都不满足理想共焦条件  $v_d \leq 2.5$ <sup>[5]</sup> 的要求, 因此图 3 中的实际响应曲线没有出现零响应点。利用图中的这些响应曲线作加权叠加, 可以构筑轴向超分辨响应曲线。如图 4 所示, 选用两组曲线作加权处理, 构筑出的响应曲线, 其轴向分辨率优化效应已经显见。

### 3 探测小孔位置对轴向分辨率的影响

关于探测小孔偏离理想位置对轴向分辨率的影响, 文献[6, 7]中已有分析。以下通过实验来考证小孔位置对系统轴向分辨率的影响。图 2 中的物镜选用数值孔径为 0.25, 共轭距为 195 mm, 集光镜数值孔径为 0.25, 探测小孔半径  $r_d = 2.5 \mu\text{m}$ 。

图 5 示出了小孔在三个不同位置处的响应曲线, 为便于比较已对曲线作了平移, 鉴于实验中探测小孔归化光学尺寸  $v_d = 8$ , 明显不满足理想共焦条件, 因而其轴向响应曲线半强度宽度即使在焦点处也比理想共焦情形要宽, 并且零点已经消失。此外, 球差因素(物镜共轭距使用条

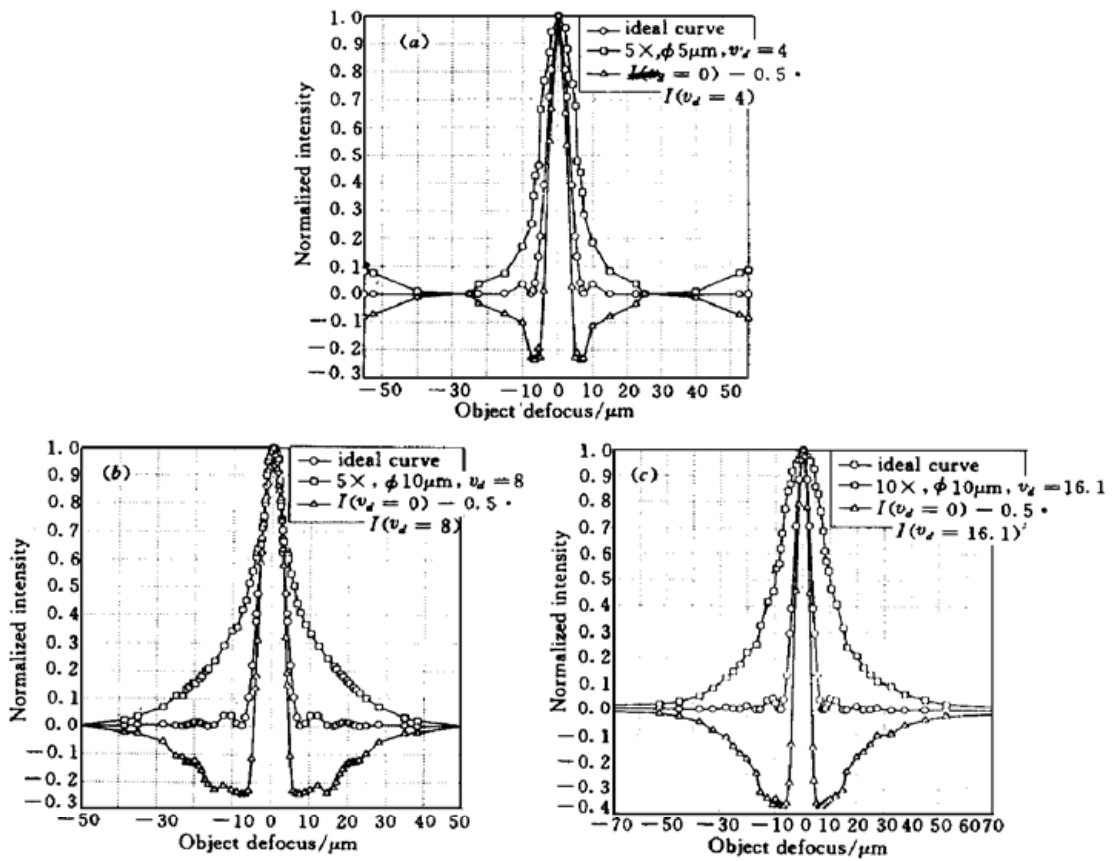


图 4 选用图 3 中两组不同的曲线构筑轴向响应曲线

Fig. 4 Constructed axial responses from weighted addition of two axial responses shown in Fig. 3, one is the theoretical signal, and the other is the signal from a large detector with different size

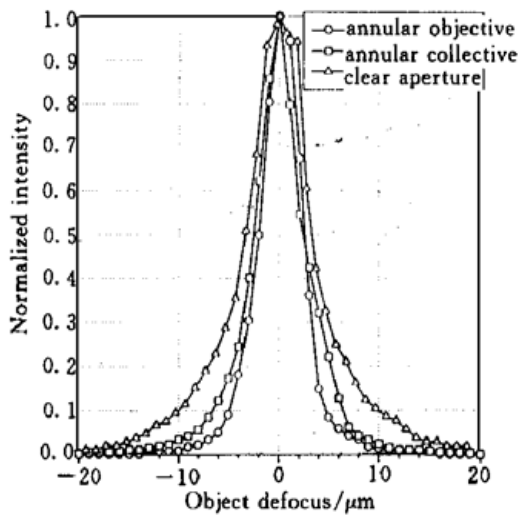


图 5 探测小孔不同位置处的轴向响应曲线

Fig. 5 Effect of pinhole displacement on axial response

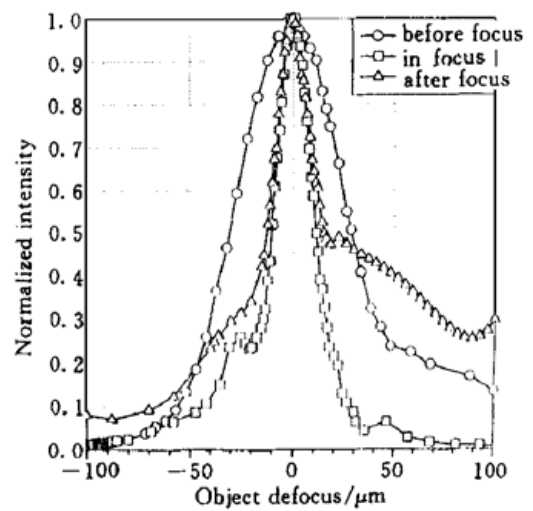


图 6 物镜遮挡、集光镜遮挡和无遮挡条件下的轴向响应曲线比较

Fig. 6 Comparison of axial responses for annular objective, annular collective and two clear apertures. Here a collective with N. A. of 0.25 and a pinhole with radius of  $2.5 \mu\text{m}$  are implemented

件不符合要求) 也使响应曲线半强度宽度变宽。当小孔位置由焦点处沿轴移动到焦前位置和焦后位置的同时, 其横向位置也发生了一定的偏移, 因而其轴向响应曲线的半强度宽度又比焦点处增宽, 响应曲线的非对称性主要来源于物镜球差和透过率分布的非均匀性。

### 4 光瞳函数对轴向分辨率的影响

利用光瞳变迹术如圆环透镜, 可以提高成像系统的横向分辨率, 但同时会改变成像系统的轴向分辨特性<sup>[7, 8]</sup>。现以圆环透镜为例, 考证光瞳函数对系统轴向分辨率的影响。实验装置参见图 2, 选用数值孔径为 0.30 的物镜, 无穷远共轭。

图 6 为物镜中心遮挡、集光镜中心遮挡和无中心遮挡三种不同条件下系统轴向响应的实验曲线。在探测器归化光学尺度  $v_d = 8$  的条件下, 使用 0.5 遮挡比的物镜和透明集光镜, 或者使用 0.5 遮挡比的集光镜和透明物镜, 系统轴向分辨率都比无中心遮挡时提高了, 而且物镜中心遮挡与集光镜中心遮挡的效果相似。

图 7 为无中心遮挡与有中心遮挡两种情形下, 轴向响应曲线半强度宽度随小孔归化光学尺度变化的比较曲线。结果表明, 当探测器为有限尺度时, 中心遮挡能提高系统的轴向分辨率。

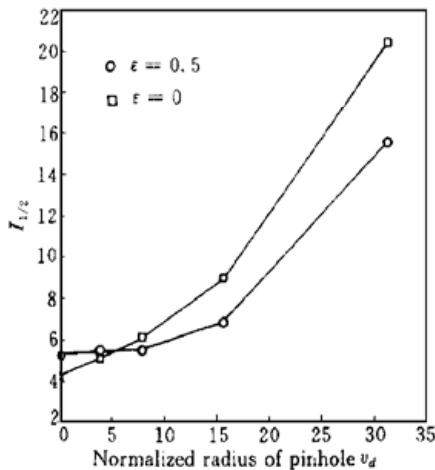
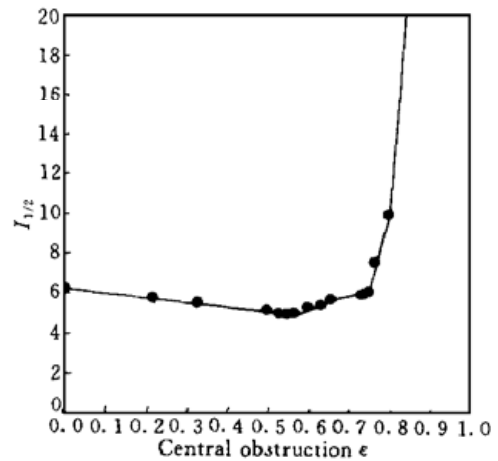


图 7 轴向响应曲线的半强度宽度随归化小孔光学尺度的变化关系

Fig. 7 Variation of the half-width of the axial response with the normalized radius of pinhole  $v_d$



8 轴向响应曲线半强度宽度与遮挡比的关系曲线  
实验中集光镜数值孔径为 0.25, 探测小孔半径  $r_d = 2.5 \mu\text{m}$

Fig. 8 Variation of the half-width of the axial response with the central obstruction  $\epsilon$

Here a collective with N. A. of 0.25 and a pinhole with radius of  $2.5 \mu\text{m}$  are implemented

图 8 为轴向响应曲线半强度宽度随中心遮挡比变化的实验曲线。结果表明, 对于特定探测小孔归化尺度来说, 中心遮挡比存在一优化值, 使得轴向响应曲线的半强度宽度达到最小。本实验中遮挡比的优化值约为 0.55, 它对应于探测小孔归化尺度  $v_d = 8$ 。

### 5 讨论与结论

共焦扫描显微术中轴向分辨率受单元探测器尺寸、探测器位置精度、物镜像差、光瞳函数等多种因素制约。如果系统中采用低倍率的集光镜, 则可缓解探测器尺寸与位置精度对轴向分

辨特性的影响。物镜像差则是系统轴向分辨特性的最后制约因素。

利用圆环透镜和有限尺度探测小孔的组合可以优化共焦系统的轴向分辨性质,削弱物镜球差的消极影响,并确保有较高的能量通过率。

采用面阵探测器替代常规的小孔探测器,可以实现系统的负值响应,进而构筑出超分辨响应曲线。

### 参 考 文 献

- 1 C. J. R. Sheppard. Scanning Optical Microscopy. in *Advances in Optical and Electron Microscopy*, Vol. 10, R. Barer, V. E. Cosslett Eds., London: Academic Press, 1987. 1~ 98
- 2 T. Wilson. *Confocal Microscopy*. London: Academic Press, 1990. 93~ 184
- 3 T. Wilson. Depth response of scanning microscopes. *Optik*, 1989, **81**(3): 113~ 118
- 4 Z. Ding, Z. Bao, W. Tian *et al.*. Superresolution in confocal scanning system. *Proceedings of JICAST'98/CPST'98*, 1998. 233~ 236
- 5 T. Wilson, A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.*, 1987, **12**(4): 227 ~ 229
- 6 T. Wilson, A. R. Carlini. Effect of detector displacement in confocal imaging systems. *Appl. Opt.*, 1988, **27**(18): 3791~ 3799
- 7 S. Kimura, T. Wilson. Effect of axial pinhole displacement in confocal microscopes. *Appl. Opt.*, 1993, **32**(13): 2257~ 2261
- 8 C. J. R. Sheppard, M. Gu. Improvement of axial resolution in confocal microscopy using an annular pupil. *Opt. Comm.*, 1991, **84**(1, 2): 7~ 13

## Analysis of the Effect of Various Factors on Axial Resolution in Confocal Scanning Microscopy

Ding Zhihua Bao Zhengkang Liu Yu Bao Xiaohui

(State Key Lab of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

**Abstract** The effect of various factors on axial resolution in confocal scanning microscopy is discussed. and some preliminary experimental results are given. Possible approaches for axial resolution optimization are also demonstrated.

**Key words** axial resolution, confocal scanning microscopy, pinhole-size detector, pupil-function