

文章编号: 0258-7025(2010)05-1157-05

# 非共轴激光共焦显微技术的研究现状与展望

沙定国 江 琴 赵维谦\* 邱丽荣

(北京理工大学光电学院, 北京 100081)

**摘要** 非共轴激光共焦显微技术是近年来激光共焦显微成像领域发展起来的一种新型成像方法。该成像方法将被测样品与照明光轴成一定角度放置,使得照明光轴与采集光轴形成一定的夹角,减小系统集成焦体体积、提高轴向分辨率。与传统的共焦显微技术相比,该方法可以有效兼顾激光共焦显微系统的轴向分辨率、工作距和视场大小。介绍了非共轴激光共焦显微技术的成像原理,详述了共焦  $\theta$  显微技术和双轴共焦显微技术这两种典型的非共轴激光共焦显微技术的研究现状和发展趋势,简述了在双轴共焦显微技术领域的研究设想。

**关键词** 显微技术;共焦  $\theta$  显微技术;双轴共焦显微技术;小型化;光瞳滤波;差动共焦测量

中图分类号 TN249 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20103705.1157

## Review and Expectation of Non-Coaxial Laser Confocal Microscopy

Sha Dingguo Jiang Qin Zhao Weiqian Qiu Lirong

(School of Optic-Electronic, Beijing Institution of Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract** Non-coaxial laser confocal microscopy is a novel imaging method of laser confocal microscopy. By observing the sample at an angle to the illumination axis, this method decreases the observation volume of overlap and then improves the axial resolution. Compared with the conventional confocal microscopy, this method has gained wide attention for its advantage that it can improve the resolution, working distance and field of view simultaneously. We summarize the key principle of the non-coaxial laser confocal microscopy, and expand the recent progress and development trend of two typical non-coaxial laser confocal microscopies, confocal  $\theta$  microscopy and dual-axes confocal microscopy. Finally we briefly introduce our researching plan.

**Key words** microscopy; confocal  $\theta$  microscopy; dual-axes confocal microscopy; miniaturization; pupil filtering; differential confocal measurement

## 1 引 言

提高分辨率一直是激光共焦显微技术研究领域的永恒课题。由于衍射现象的限制,依靠增大物镜的数值孔径(NA)和减小光源波长提高分辨率的方法局限性很大,远不能满足日益增长的高精密成像和测量对分辨率的要求。此外,随着航天技术、空间生物技术等领域的发展,对仪器的小型化要求也日趋迫切。针对于此,国内外学者做了许多努力<sup>[1~9]</sup>。近年来发展起来的非共轴激光共焦显微技术首次通过改进共焦显微技术的光路结构达到了提高轴向分

辨力的目的,且具有大工作距离、大视场和易于小型化等优势。目前,非共轴激光共焦显微技术主要包含共焦  $\theta$  显微技术和双轴共焦显微技术两个典型的研究方向,国外大多还处于原理性研究阶段<sup>[10~18]</sup>,仅小部分进入仪器化研究阶段<sup>[19~31]</sup>,且主要应用方向集中在生物医学领域,而国内的相关研究尚未起步。无论是从提高轴向分辨率、增大工作距离的角度出发还是从易于小型化的角度考虑,非共轴激光共焦显微技术都能很好地满足现有高精密成像与测量对仪器的要求,具有良好的发展潜力。

收稿日期: 2009-03-31; 收到修改稿日期: 2009-07-06

基金项目: 国家自然科学基金(60708015, 60927012)和北京理工大学优秀青年教师资助计划(2008Y0101)资助课题。

作者简介: 沙定国(1943—),男,教授,博士生导师,主要从事光学与光电检测技术及仪器等方面的研究。

E-mail: shadingguo@263.net

\* 通讯联系人。E-mail: zwq669@126.com

本文介绍了非共轴激光共焦显微技术的研究现状,并展望其未来的发展趋势。

## 2 基本原理

非共轴激光共焦显微技术的基本原理<sup>[10,11]</sup>是将共焦显微系统中被测样品与照明光轴成一定角度放置,使得照明光轴与采集光轴形成一定的夹角,如图 1 所示。由于激光共焦显微系统的点扩散函数(PSF)是照明 PSF 与采集 PSF 的乘积,因此当两个光轴不共轴时,两个点扩散函数会相互制约,重叠部分明显减小,使得系统的合成焦体体积减小。焦体越小,显微系统就能观察被测样品的更精细结构的信息,从而达到提高共焦系统轴向分辨力的目的<sup>[10]</sup>。理论上当两个光轴正交时,系统的合成焦体体积最小,可形成一个近乎球形的焦体。

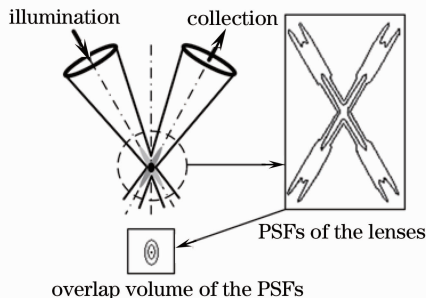


图 1 成一定角度放置的两个物镜的 PSFs  
Fig. 1 PSFs of the two angled lenses

## 3 研究现状

### 3.1 共焦 theta 显微技术

1994 年, E. H. K. Stelzer 等<sup>[10,12]</sup>提出了一种新的共焦 theta 显微技术,将照明光轴和采集光轴正交放置,首次对激光共焦显微技术在光路结构上进行了改进。该技术使得系统的 PSF 在轴向和横向上的尺寸变成相近,但牺牲了横向分辨力。比如,物镜  $NA=0.94$  的共焦 theta 双光子荧光显微镜的焦体体积为  $51 \times 10^6 \text{ nm}^3$ ,轴向分辨力为  $230 \text{ nm}$ , $x$  方向的横向分辨力为  $290 \text{ nm}$ 。与同等条件下的共焦荧光显微镜相比,该技术的焦体体积缩小至原体积的 45%,轴向分辨力提高了 3.5 倍,横向分辨力降低了 53%。通过对包括传统显微镜、共焦显微镜、4Pi 共焦显微镜和共焦 theta 显微镜在内的各种显微镜的轴向分辨力和焦体体积进行比较<sup>[10]</sup>,发现共焦 theta 显微系统对轴向分辨力的提高程度最大。

随后 S. Linde 等<sup>[13]</sup>提出了一种三物镜共焦 theta 显微技术,如图 2 所示。该技术通过三个水浸

物镜从三个方向对样品进行照明/探测,观察过程中无需移动或旋转样品,解决了传统显微镜在观察过程中需要移动样品而带来像差以及成像图像重叠等问题。

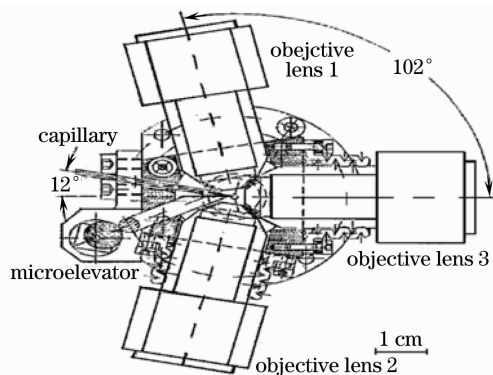


图 2 三物镜共焦 theta 显微镜  
Fig. 2 Confocal theta microscope with three objective lenses

2001 年, O. Haerberlé 等<sup>[14]</sup>提出了一种多物镜共焦 theta 显微技术,其融合 4Pi 共焦显微技术和共焦 theta 显微技术,利用四个物镜照明、两个物镜探测。该技术通过长工作距离的  $NA=0.8$  的水浸物镜理论上可产生近  $100 \text{ nm}$  的三维分辨力,但该研究未给出实际实验系统。

上述共焦 theta 显微系统均使用两个或两个以上的物镜来构建独立的照明光路和采集光路,这种结构使得光学器件的数量翻倍,增加了光路调整的复杂程度。为此, J. Swoger 等<sup>[15]</sup>提出了一种单物镜共焦 theta 显微系统(SLTM),该系统采用单一显微物镜,在物镜及其焦面之间放置一个反射镜单元,偏转入射光和出射光,使得采集光轴和照明光轴形成正交,如图 3 所示。此后,他们又在该系统中引入光纤,可根据不同需求更换光纤,从而可使用不同波长的激光光源进行工作,如图 4 所示。该技术的缺

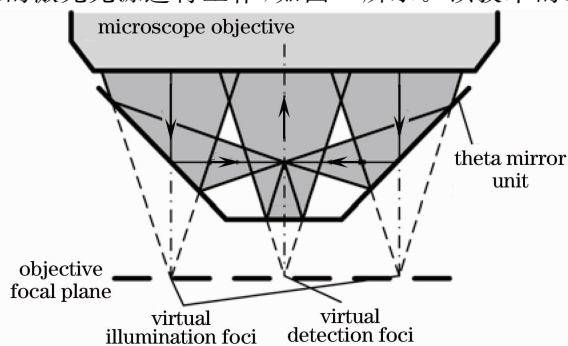


图 3 SLTM 的照明与探测光路细节图  
Fig. 3 Details of illumination and detection light paths in SLTM

陷是工作距离比双物镜的共焦  $\theta$  显微系统的短,限制了可测试样品的种类。

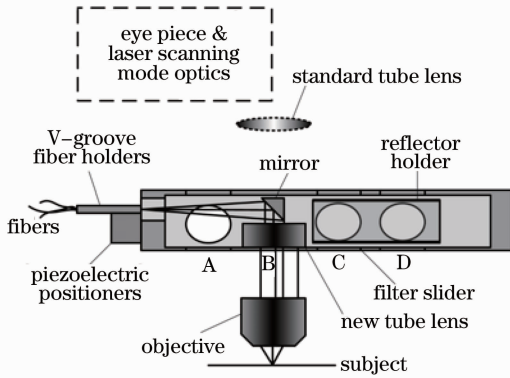


图 4 光纤耦合单物镜  $\theta$  显微镜光路图  
Fig. 4 Light path of confocal fiber-coupled single-lens  $\theta$  microscope

此后, M. Rajadhyaksha 等<sup>[16~18]</sup>提出了一种单物镜的共焦  $\theta$  线扫描显微技术,如图 5 所示。该技术引入了分区光瞳结构和基于线性 CCD 探测器阵列的线性扫描技术,大大简化了光路的调整难度,使得系统只有 7 个主要光学元件。实验系统使用 830 nm 的近红外光源,分区光瞳物镜  $NA=0.8$ , 光学层析能力可达  $1\sim 10\ \mu\text{m}$ , 横向分辨力  $1\sim 2\ \mu\text{m}$ , 视场  $0.5\sim 1.0\ \text{mm}$ 。该系统只适用于带有轻微散射和像差的人体表皮或上皮成像。由于线扫描的对比度较之点扫描下降得很快,因此该系统不适合用于高散射样品。

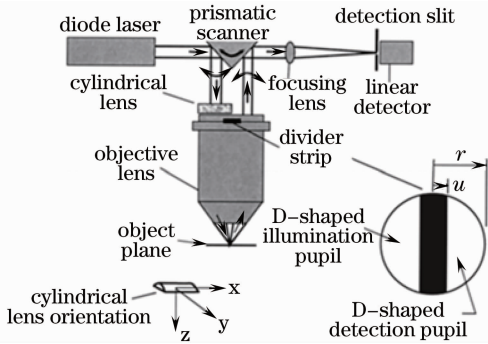


图 5 共焦  $\theta$  线扫描显微镜的光路设计  
Fig. 5 Optical design of confocal  $\theta$  line-scanning microscope

### 3.2 双轴共焦显微技术

1999 年美国 Wellman 光子医学实验室的 R. H. Webb 等<sup>[11]</sup>设计了一种基于非共轴共焦显微技术基本原理的新型显微系统,与共焦  $\theta$  显微系统的主要区别在于其所使用物镜的数值孔径相对较小,且两光轴夹角均小于  $90^\circ$ 。该系统实验光路的工作距离可达 20 mm,非常适合用于活体细胞学领域。

2003 年 T. D. Wang 等<sup>[19]</sup>首次提出了双轴共焦显微镜这一名称,设计了一种新型共焦显微系统。该系统将两个独立的低数值孔径物镜( $FL_1$  和  $FL_2$ )分别用于照明光路和采集光路,令两光路的光轴与系统中心轴线夹角为  $\theta$ (如图 6 所示)。该实验系统基于半峰全宽(FWHM)的横向和轴向分辨力可分别达  $1.3$  和  $2.1\ \mu\text{m}$ 。利用该系统采集散射介质的图像,具有高横向和轴向分辨力、大工作距离、大视场以及散射噪声少的优点。

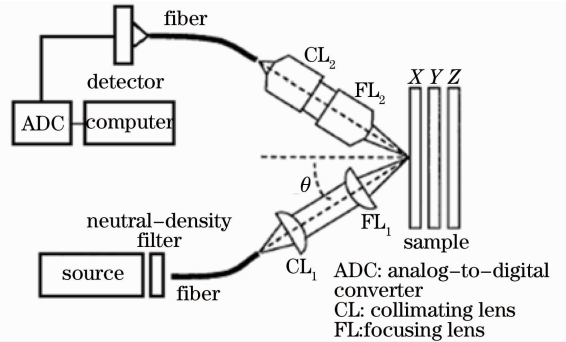


图 6 双轴共焦显微系统示意图  
Fig. 6 Schematic of dual-axes confocal microscope system

此后,该研究小组在双轴共焦显微系统中引入后置扫描和低相干外差检波技术<sup>[20~23]</sup>,光路原理如图 7 所示。低相干外差检波技术可提高系统的动态范围,使其超过 70 dB。后置扫描结构是在物镜与样品之间放置一个扫描反射镜(SM),用来控制光束进行扫描。由于该系统中光束扫描不是通过物镜扫描来实现的,因此其物镜可以使用简单的、易于小型化的低数值孔径物镜,而不会在光束扫描过程中引入像差等不良影响。而传统的单轴共焦显微镜的工作距离通常较短,很难使用后置扫描方式。最终实

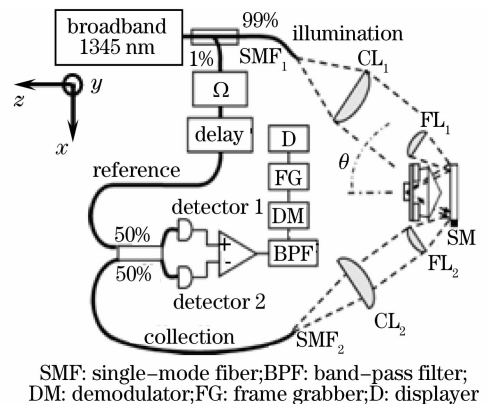


图 7 后置扫描双轴共焦显微系统成像示意图  
Fig. 7 schematic of dual-axes confocal microscope with post-scanning

验系统的分辨力可达  $4\sim 5\ \mu\text{m}$ , 可探测样品组织深度达  $610\ \mu\text{m}$ 。后置扫描方式可以提供  $610\ \mu\text{m}\times 640\ \mu\text{m}$  的大视场。光路系统通过优化设计, 不需要加入低相干光栅即可有效地防止焦外散射光进入测量光路。

2005 年, Hyejun Ra 等<sup>[24]</sup> 研究了可用于双轴共焦显微系统的高分辨力微机电系统 (MEMS) 扫描器, 随后 Liu 等<sup>[25~27]</sup> 将光纤以及 MEMS 器件引入双轴共焦显微系统。在上述基础上, M. J. Mandella 等<sup>[28,29]</sup> 开始研究用于内窥镜的小型双轴共焦显微镜, 对其光路进行了紧凑化的设计, 光路原理如图 8 所示。该系统引入了一个抛物面反射镜作为照明和采集物镜, 可保证任意两个平行的准直光束入射到反射镜之后都可以在其焦点相交。该抛物面反射镜中心开孔, 可以放置用于折射率匹配的半球镜, 辅助减小各种像差。一个定制的二维 MEMS 扫描反射镜用以控制光束对样品进行扫描。

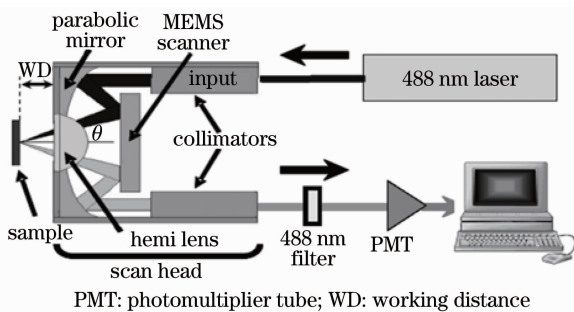


图 8 双轴共焦显微镜光路原理图

Fig. 8 Diagram of the dual-axes confocal microscope

斯坦福大学的研究小组最终制成两种规格的双轴共焦探针<sup>[29~31]</sup>, 如图 9 所示, 封装直径分别为 10 和 5 mm, 对非活体和活体成像均适用。探针可探测的组织深度可达  $300\ \mu\text{m}$ , 最大视场为  $800\ \mu\text{m}\times 450\ \mu\text{m}$ , 最高图像获取速度为 5 frame/s, 横向和轴向分辨力分别为 5 和  $7\ \mu\text{m}$ 。

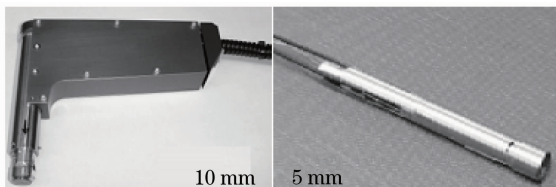


图 9 手持双轴共焦显微镜

Fig. 9 Hand-held dual-axes confocal microscopes

#### 4 超分辨双轴差动共焦显微技术

根据非共轴激光共焦显微技术的特点, 双轴共焦显微技术在实际应用中有着明显的优势。但是双

轴共焦显微技术轴向分辨力的提高是以牺牲部分横向分辨力为代价的, 且其单一探测器的设计不利于消除光源的光强漂移和探测器的电子漂移等共模噪声, 不具备绝对位置瞄准和双极性跟踪等能力。为此, 我们提出了一种新的超分辨双轴差动共焦显微技术, 融合现有的光瞳滤波技术<sup>[1~9]</sup>、差动处理技术等<sup>[32~34]</sup>, 弥补了现有双轴共焦显微技术在横向分辨力上的不足, 同时进一步提高其轴向分辨力, 并改善了抗干扰能力和线性范围, 具备绝对位置瞄准和双极性跟踪等能力。系统光路示意图如图 10 所示。

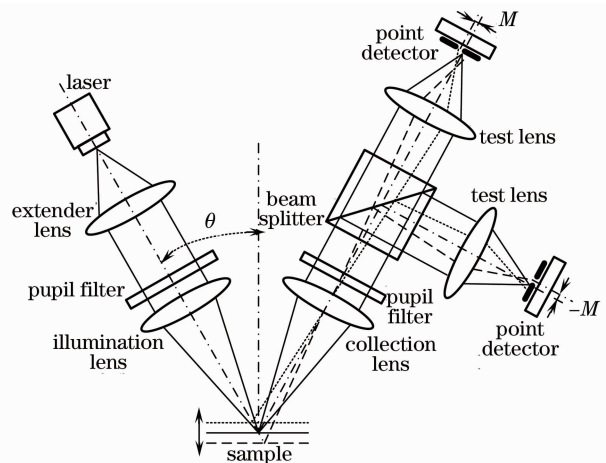


图 10 超分辨双轴差动共焦显微系统框图

Fig. 10 Schematic of supersolution dual-axial differential confocal microscopy

#### 5 结 论

非共轴激光共焦显微技术主要有共焦 theta 显微技术和双轴共焦显微技术两个典型的研究方向, 其主要优势包括轴向分辨力高、杂散光抑制能力强、探测灵敏度高、动态范围大, 尤其适用于高散射率的生物样品检测领域。共焦 theta 显微技术通常选用较高数值孔径物镜, 分辨力相对较高, 但相对工作距离较小。与共焦 theta 显微技术相比, 双轴共焦显微技术采用了较低数值孔径物镜, 相对工作距离较大, 达到的分辨力足以满足生物活体成像领域的测量要求。同时双轴共焦显微技术结合光纤技术和 MEMS 技术后, 结构日趋紧凑和简单, 易于小型化和便携化。

非共轴激光共焦显微技术的横向分辨力较低, 现有的轴向分辨力还不能完全满足测试需求, 且在消除光源的光强漂移和探测器的电子漂移等共模噪声方面存在缺陷, 并且不具备绝对位置瞄准和双极性跟踪等能力。因此, 弥补上述缺陷, 进一步完善该

技术成像特性,且实现系统仪器化和小型化是该技术今后发展的方向。

### 参 考 文 献

- M. A. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson *et al.*. Optimized pupil-plane filters for confocal microscope point-spread function engineering[J]. *Opt. Lett.*, 2000, **25**(4): 245~247
- D. M. de Juana, José E. Oti, V. F. Canales *et al.*. Transverse or axial superresolution in a 4Pi confocal microscope by phase-only filters [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2003, **20** (11): 2172~2178
- Zhao Weiqian, Tan Jiubin, Qiu Lirong. Bipolar absolute differential confocal approach to higher spatial resolution [J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(21): 5013~5021
- Zhao Weiqian, Tan Jiubin, Qiu Lirong. Tri-heterodyne confocal microscope with axial superresolution and higher SNR[J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(21): 5191~5197
- Zhao Weiqian, Qiu Lirong, Feng Zhengde. Effect of fabrication errors on superresolution property of a pupil filter [J]. *Opt. Express*, 2006, **14**(16): 7024~7036
- Zhao Weiqian, Qiu Lirong, Chen Shanshan. Image restoration phase-filtering lateral superresolution confocal microscopy [J]. *Chin. Phys. Lett.*, 2006, **23**(4): 856~859
- Qiu Lirong, Zhao Weiqian, Feng Zhengde. An approach to higher spatial resolutions in a laser probe measurement system using a phase-only pupil filter[J]. *Opt. Eng.*, 2006, **45**(11): 113601
- Yun Maojin, Liu Liren, Sun Jianfeng *et al.*. Study on three-dimensional superresolving performances of complex amplitude pupil filters[J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(4): 475~478  
云茂金,刘立人,孙建峰等. 复振幅光瞳滤波器的三维超分辨性能研究[J]. *光学学报*, 2005, **25**(4): 475~478
- Ding Hongping, Li Qinghui, Zou Wenyi. Design of 3-Zone amplitude-type superresolution pupil filters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(9): 1177~1180  
丁洪萍,李庆辉,邹文艺. 三区振幅型超分辨光瞳滤波器设计 [J]. *光学学报*, 2004, **24**(9): 1177~1180
- E. H. K. Stelzer, S. Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy [J]. *Opt. Commun.*, 1994, **111**: 536~547
- R. H. Webb, F. Rogomentich. Confocal microscope with large field and working distance [J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(22): 4870~4875
- S. Lindek, E. H. K. Steizer. Confocal theta microscopy and 4Pi-confocal theta microscopy[C]. *SPIE*, 1994, **2184**: 188~194
- S. Linde, R. Pick, E. H. K. Stelzer. Confocal theta microscope with three objective lenses [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 1994, **65**(11): 3367~3372
- O. Haerberlé, C. Xu, A. Dieterlen *et al.*. Multiple-objective microscopy with three-dimensional resolution near 100 nm and a long working distance [J]. *Opt. Lett.*, 2001, **26** (21): 1684~1686
- J. Swoger, S. Lindek, T. Stefany *et al.*. A confocal fiber-coupled single-lens theta microscope (FC-SLTM)[J]. *Rev. Sci. Instr.*, 1998, **69**(8): 2956~2963
- M. Rajadhyaksha, P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio *et al.*. Confocal theta line-scanner for imaging skin: a comparison to the point scanner[C]. OSA/FIO 2004, FWM1
- P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio, J. M. Zavislan *et al.*. Confocal reflectance theta line scanning microscope for imaging human skin in vivo[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(7): 942~944
- P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio, M. Rajadhyaksha. Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues[J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(10): 1843~1851
- T. D. Wang, M. J. Mandella, C. H. Contag *et al.*. Dual-axis confocal microscope for high-resolution in vivo imaging[J]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(6): 414~416
- T. D. Wang, C. H. Contag, M. J. Mandella *et al.*. Dual-axes confocal microscopy with post-objective scanning and low-coherence heterodyne detection[J]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(20): 1915~1917
- T. D. Wang, C. H. Contag, M. J. Mandella *et al.*. Confocal fluorescence microscope with dual-axis architecture and biaxial postobjective scanning [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2004, **9** (4): 735~742
- G. Kino, T. Wang, C. Contag *et al.*. Performance of dual axes confocal microscope for in vivo molecular and cellular imaging [C]. *SPIE*, 2004, **5324**: 35~46
- J. T. C. Liu, M. J. Mandella, S. Friedland *et al.*. Dual-axes confocal reflectance microscope for distinguishing colonic neoplasia[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(5): 054019
- Hyejun Ra, I. Jung, D. Lee *et al.*. High-resolution microelectromechanical scanners for miniaturized dual-axes confocal microscopes[C]. *SPIE*, 2005, **5721**: 132~135
- J. T. C. Liu, M. J. Mandella, H. Ra *et al.*. Miniature near-infrared dual-axes confocal microscope utilizing a two-dimensional microelectromechanical systems scanner[J]. *Opt. Lett.*, 2007, **32**(3): 256~258
- H. Ra, W. Piyawattanametha, Y. Taguchi *et al.*. Two-dimensional MEMS scanner for dual-axes confocal microscopy [J]. *J. Microelectromechanical Systems*, 2007, **16** (4): 969~976
- H. Ra, W. Piyawattanametha, Y. Taguchi *et al.*. Reflectance and fluorescence imaging with a MEMS dual-axes confocal microscope[C]. *SPIE*, 2007, **6466**: 64660G
- M. J. Mandella, J. T. C. Liu, W. Piyawattanametha *et al.*. Compact optical design for dual-axes confocal endoscopic microscopes[C]. *SPIE*, 2007, **6443**: 64430E
- H. Ra, W. Piyawattanametha, M. J. Mandella *et al.*. Three-dimensional in vivo imaging by a handheld dual-axes confocal microscope[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(10): 7224~7232
- K. Loewke, D. Camarilloa, W. Piyawattanametha *et al.*. Real-time image mosaicing with a hand-held dual-axes confocal microscope[C]. *SPIE*, 2008, **6851**: 68510F
- W. Piyawattanametha, H. Ra, M. J. Mandella *et al.*. In vivo clinical and intravital imaging with MEMS based dual-axes confocal microscopes[C]. in NTM 2009, NWC1
- Zhao Weiqian, Tan Jiubin, Qiu Lirong *et al.*. A new laser heterodyne confocal probe for ultraprecision measurement of discontinuous contours [J]. *Measure. Sci. Technol.*, 2005, **16**(2): 497~504
- Zhao Weiqian, Tan Jiubin, Qiu Lirong. Improvement of confocal microscope performance by shaped annular beam and heterodyne confocal techniques[J]. *Optik*, 2005, **116**(3): 111~117
- Zhang Jianhuan, Zhou Junxian. Effect of tilt angle of surface to be measured on differential confocal microscope pointing signal [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(9): 1363~1366  
张建寰,周军现. 测量表面倾角对差动共焦瞄准信号影响分析 [J]. *光学学报*, 2006, **26**(9): 1363~1366