

“细胞工厂”显微监测装置的光学设计

李琦 向阳 谷俊达 董萌

(长春理工大学, 吉林 长春 130022)

摘要 基于目前国内对于细胞工厂(1~40 层培养皿)监测观察方法的局限性,为了方便观察,节省时间,提高工作效率,设计出一款用于监测“细胞工厂”中培养细胞的长工作距离的视频显微物镜。设计利用卡塞格林反射系统,放大倍率为 5×,工作距离 85 mm,数值孔径(NA)达到 0.3,根据培养皿中的细胞大小,经过计算,运用 ZEMAX 软件进行模拟,配以维视图像生产的 MV-200UC 1/3"电荷耦合器件(CCD)进行观察,接以视频显示器二次放大,总放大倍率 M 在 200 倍左右,系统分辨的最小距离在 1.1 μm 左右,满足分辨培养皿细胞的要求。

关键词 光学设计; 高分辨率; 细胞工厂; 长工作距; 显微物镜

中图分类号 TH742 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201441.1016002

Optical Design of “Cell Factory” Microscopic Monitoring Device

Li Qi Xiang Yang Gu Junda Dong Meng

(Changchun University of Science and Engineering, Changchun, Jilin 130022, China)

Abstract Due to the limitation of observation method in cell factory (1~40 layer dishes) monitoring in China, this paper designs a long-working-distance video objective for observing the cultured cells in cell factory, to facilitate the observation, save time and improve efficiency. According to the size of cells, the high resolution video objective, with 5 times magnification and 85 mm working distance, is designed by applying ZEMAX stimulation and Cassegrain reflector system. Amplified again by the video display, the total magnification is about 200 times, the numerical aperture is up to 0.3 and the liner field object height y is 0.6 mm, equipped with MV-200UC 1/3" charge couple device (CCD) produced by Microvision in observation. The minimum distance resolution of the system is about 1.1 μm , meeting the requirement of distinguishing petri dish cells.

Key words optical design; high resolution; cell factory; long working distance; microscope objective

OCIS codes 220.4610; 220.3620; 110.0180

1 引言

为适应医药工业比如疫苗、单克隆抗体、细胞治疗等生产企业大规模细胞培养需要,近 20 年来,我国“细胞工厂”培养技术迅速发展。“细胞工厂”是 1~40 层细胞培养装置,这就需要生产企业对 1~40 层培养皿中细胞进行实时监测。如何用光学系统观察到每一层细胞的大小和生长过程,是本课题研究的重点。

目前国内对于细胞工厂监测观察的方法主要是,

利用传统倒置显微镜直接观察到底部细胞的生长情况,只适用于检查细胞层的均匀度。这种方法存在很大局限性,只适合于转瓶培养。不能实时监测多层培养皿内的细胞生长状况,只能监测单层培养皿。倒置显微镜工作距离很短,只有几毫米左右,观察 1~40 层培养皿极其浪费时间与精力。所以为了方便观察,节省时间,提高工作效率,需要一种高分辨率的“细胞工厂”显微光学系统,斜置固定,通过机械上下移动距离直接对多层的细胞工厂进行观测。

收稿日期: 2014-04-04; **收到修改稿日期**: 2014-05-16

作者简介: 李琦(1990—),男,硕士研究生,主要从事光学工程、生物医学工程方面的研究。

E-mail: 931324291@qq.com

导师简介: 向阳(1968—),男,教授,硕士生导师,主要从事光学工程、光电仪器、光电检测、生物医学工程等方面的研究。E-mail: xyciom@163.com

国内不能实时监测多层培养皿内的细胞生长状况,只能监测单层培养皿。对于细胞工厂多层细胞培养皿进行实时快速、自动化的显微监测装置及技术,目前国内没有相关产品及报道。国外只有日本 Taitec 公司生产的“细胞工厂”显微监测仪,价格极其昂贵,单价在 200 万左右,国内疫苗企业就有近百家,而每个疫苗企业需要几台到几十台同时观察,国内医药企业难以承受。基于国内现状,需求量大,所以本文设计一款便于市场化,低成本,结构简单,且达到企业要求的高分辨率,高性价比的“细胞工厂”显微监测装置,填补国内技术空白,保障医药行业质量监控,具有很大的市场前景与竞争力。

2 设计思路与原理

研究了用于观测“细胞工厂”的显微监测装置的光学系统,放大倍率为 $5\times$,配合电荷耦合器件(CCD)接显示器二次放大,总放大倍率 M 在 200 倍左右,满足有效放大倍率的要求,从而达到看清和分辨微小实物(如细胞)的目的,为了能分清单位视场内的细胞,放大倍率不宜做的过大。

图 1 长工作距视频显微镜观测“细胞工厂”的原理。

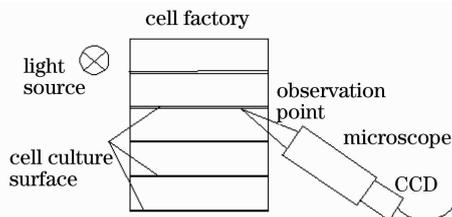


图 1 系统观测原理

Fig.1 Schematic of system observation

“细胞工厂”每层尺寸参数长宽高分别是: $335\text{ mm}\times 205\text{ mm}\times 17\text{ mm}$ 。因为每层培养皿中细胞的培养方式,生长过程与状态是一样的,所以在检测中,为了提高工作效率,如图 1 所示,看清每层培养皿底部的部分区域即可,工作距离不用做得过长。

“细胞工厂”显微监测装置不仅仅是需要长工作距离,更需要系统具有高分辨率。根据瑞利判据,由正弦条件可知,显微镜的分辨率公式: $\sigma = \frac{0.61\lambda}{NA}$, σ 为系统能分辨的最小距离,数值孔径 $NA = n\sin\mu$,显微镜的分辨率主要取决于数值孔径(NA),想要获得高分辨率,就要提高数值孔径,使物方孔径角足够大。所以设计部分选择传统的卡塞格林系统。

传统的卡塞格林光学系统属于反射式系统,没

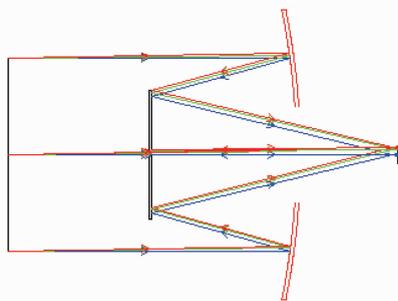


图 2 传统的卡塞格林系统

Fig.2 Traditional Cassegrain system

有色差,为了得到大数值孔径,口径可以做得足够大,尽可能接收多的能量。从消除像差的角度上看,显微物镜系统属于小像差系统,卡式系统可以在减少光学元件个数的同时消除球差,系统像差较容易校正^[1]。

卡式系统次镜通常都是利用三角支架来固定,这就大大增大了机械结构的复杂性,所以在设计中利用平行平板与次镜进行胶合,通过公差分析,满足光学零件所允许的平行与倾斜偏心公差即可,从而简化了机械结构,方便加工装调。

折反射型物镜的孔径中心有遮拦,设此系统的中心遮拦比为 γ ,轴向光束在主镜的光线高度为 h_1 ,在次镜的光线高度为 h_2 ,则遮拦比定义为

$$\gamma = \frac{h_1}{h_2}. \quad (1)$$

光学系统中次镜的存在,就一定会形成中心遮拦,还会产生衍射效应,影响成像质量。而中心遮拦对调制传递函数(MTF)也是有影响的。所以要设置中心遮拦比,以获得较好像质。

3 系统参数与设计指标

选用维视图像生产的 MV—UC200 型高分辨率工业数字相机,最高分辨率是 $1280\text{ pixel}\times 960\text{ pixel}$,像元尺寸为 $3.75\text{ }\mu\text{m}$,由此可计算出光学系统的相关参数:

1) 对角线长度即像高:

$$2h = 3.75 \times \sqrt{1280^2 + 960^2} = 6\text{ mm}. \quad (2)$$

2) 系统 MTF 的截止频率: 由公式

$$N = \frac{1000}{2 \times a} \quad (N \text{ 为极限分辨率, } a \text{ 为像元尺寸}), \text{ 可知截止频率为}$$

$$\frac{1000}{2 \times 3.75} = 133\text{ lp/mm}. \quad (3)$$

3) 一般显微物镜只能有很小的视场,因为视场

一增大,视场边缘部分的像质就会急剧变化。通常,当线视场 $2y$ 不超过物镜焦距的 $1/20$ 时,成像质量是满意的,即

$$2y \leq \frac{f'_1}{20} \quad (4)$$

设计所选取的是 $1/3''$ CCD,根据(4)式要求,线视场 $y=0.6$,系统焦距为 60 mm ,满足上述条件。

一款镜头的 MTF 曲线值通常低频表示画面轮廓,中频表示画面层次,高频表示画面细节,在 0.6 线视场,对高频和中频有所要求,MTF 值在中频 66 lp/mm 大于 0.5 ,在高频 133 lp/mm 时大于 0.3 ,尽量接近衍射极限。

表 1 系统设计参数

Table 1 System design parameters

Parameter	Value
Working distance	85 mm
Objective magnification	$\beta=5\times$
Focal length	60 mm
Numerical aperture	$NA=0.3$
Matter of high	$2y=1.2 \text{ mm}$
Detector specifications	1280 pixel \times 960 pixel
Pixel size	$3.75 \mu\text{m}\times 3.75 \mu\text{m}$

4 初始结构的选取

光学系统分为两部分,前半部分为常见的显微物镜结构形式,后半部分为传统卡塞格林系统,根据要求的物镜放大倍率 β 与数值孔径的大小来选取初始结构。

低倍消色差物镜,倍率大约为 $3\times\sim 6\times$,数值孔径为 $0.1\sim 0.15$,对应的相对孔径约为 $1/4$,采用简单的双胶合即可,但其数值孔径不够大,与设计目的不符。中倍“李斯特”型消色差物镜,数值孔径在 $0.2\sim 0.3$,为了减少高级球差,一般采取两个双胶合透镜组^[2]。如图 3 所示。

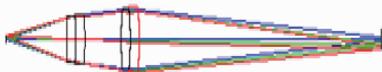


图 3 “李斯特”型显微物镜

Fig. 3 “Liszt” type microscope objective

为了便于像差校正,以“李斯特”型显微物镜的两组双胶合的中心为对称轴,类似于对称式结构,可以减小垂轴像差,即彗差、畸变、垂轴色差。同时,第一组负光焦度胶合透镜弯向光阑,有利于校正像散^[3-7]。

每个双胶合组分别消色差,这样可同时校正轴向色差与垂轴色差,即需满足光焦度方程,消色差方程

$$\Phi_1 + \Phi_2 = \Phi, \quad (5)$$

$$\frac{\Phi_1}{v_1} + \frac{\Phi_2}{v_2} = 0. \quad (6)$$

虽然数值孔径越大,分辨率越高,但考虑到工作距离长,导致透镜的尺寸过大,提高了加工成本。随着数值孔径的增大,景深也随之减小等影响。根据显微镜的分辨率公式 $\sigma = \frac{0.61\lambda}{NA}$,在数值孔径 $NA = 0.3$ 时,分辨的最小距离为 $1.1 \mu\text{m}$,配合显示器组合放大,总放大倍率 M 为 $200\times$,足以分辨与看清“细胞工厂”中的细胞,所以数值孔径不宜再增大。所以系统前部分结构采取“李斯特”型物镜设计,配合卡塞格林系统,最终结构确定。系统采用的材料光学性能优良,通过镀膜、图像处理等手段能达到预期的画面效果,并且随外界环境的变化不大,比较稳定,加工成型后成本较低,易于量产。

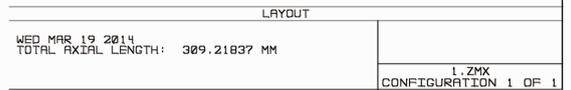
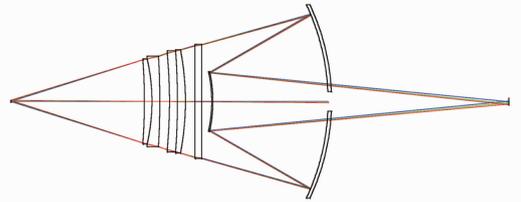


图 4 初始结构图

Fig. 4 Initial structure

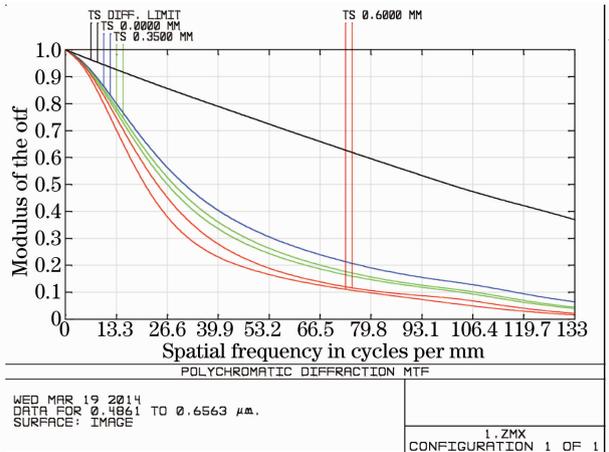


图 5 初始结构的 MTF 曲线

Fig. 5 MTF curves of the initial structure

5 像差分析及校正

在初始结构已经确定,基本结构满足的前提下,观察图 6,7 系统的 MTF 曲线与点列图,显然与最终的要求不符。所以再进行优化,并对初级像差进行分析^[4-6]。根据显微镜镜视场小,相对孔径不大等特点,应保证其轴上点和近轴物点有很好的成像质量。所以在像差校正时,对应的像高 y' 二次方以上的像差如像散、场曲、畸变等及高级像差(孔径角、视场越大,像散现象越明显)一般不专门考虑,着重考虑球差、彗差、位置色差等。同时,尽量将像散、场曲和畸变降到最小。

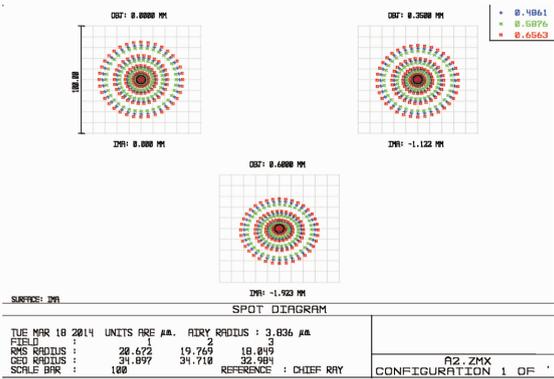


图 6 初始结构的点列图

Fig. 6 Spot diagram of the initial structure



图 7 赛德尔图

Fig. 7 Seidel diagram

整个系统的像差校正,是在前后组透镜分别校正像差的基础上再进行综合平衡。两个双胶合镜组光焦度“一 +”一负一正,镜组类似于对称结构利于校正初级像差^[7-10]。

通过对初始结构的优化,结合(6)、(7)式与赛德尔数来进行判断,由小视场光学系统的相对彗差 K_{sc} 为

$$K_{sc} \leq 0.0025. \quad (7)$$

系统的色差公差:

$$\Delta L'_{lc} \leq \frac{\lambda}{n' \sin^2(u'm)}. \quad (8)$$

由(7)、(8)式可知,系统位置色差与彗差相对不大,而球差偏大,所以着重考虑球差。通过球差公差表达式来判定系统球差的合理性:显微镜光学系统都具有初级和二级球差,边缘孔径处球差校正后,在 0.707 带上具有最大剩余球差,做 $\frac{3}{4}\Delta L'_{0.707}$ 轴向离焦,球差公差严格表达式为

$$\delta L'_{0.707} \leq \frac{6\lambda}{n' \sin^2(um')}. \quad (9)$$

根据(9)式求得,系统容许的最大剩余球差为 2.1966。

分析各个面球差,通过设置操作数 SPHA 和 LONA,继续校正球差,并相应针对各个面加大权重,在满足其他条件的前提下,分析赛德尔图和点列图继续优化,设置相应的操作数,经过反复的分析与优化,直到使数值达到球差公差的范围,最终获得能够满足设计指标参数以及性能要求的系统。

6 设计结果

根据设计指标与要求,计算光学系统的初始结构,通过像差分析校正,不断优化 MTF 曲线与点列图,结合公差系统理论,调整评价函数,添加焦距,系统总长操作数,将镜片曲率、厚度设置为变量,经过反复优化,最终设计结果如图 8 所示。光学系统工作距离 85 mm,物镜放大率 β 为 $5\times$,数值孔径 $NA=0.3$,线视场物高 $2y=1.2$ mm,系统的遮拦比为 30%。综合考虑次镜遮拦所造成的像质影响,对像质进行了更加实际的评价。结构紧凑,公差均根据国标而定,方便生产加工。

从 MTF 曲线上可看出,MTF 值在中频 66 lp/mm 大于 0.5,在高频 133 lp/mm,CCD 截止

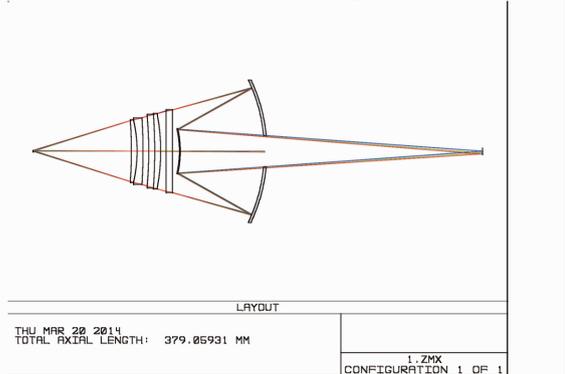


图 8 最终结构示意图

Fig. 8 Final structure diagram

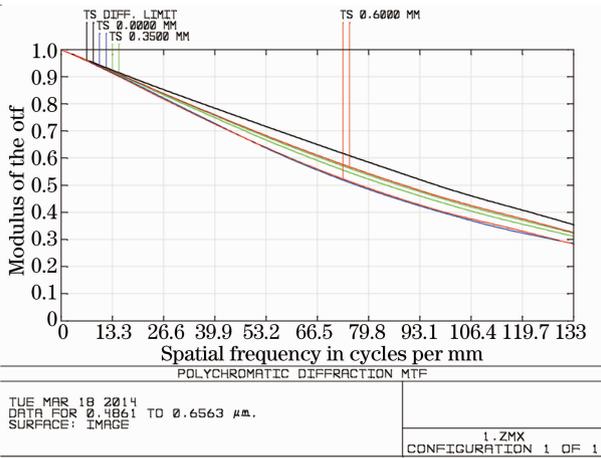


图 9 MTF 曲线图

Fig.9 MTF curves

频率时 MTF 值约为 0.3,而且从该图可以看出各视场的子午和弧矢重合较好,有较好的成像质量。

通过观察点列图图 10 所示,分析均方根(RMS)弥散斑大小,如表 2 所示。

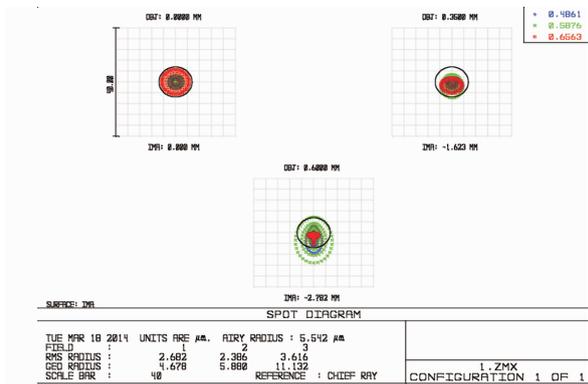


图 10 系统点列图

Fig.10 System spot diagram

表 2 各视场均方根弥散斑大小

Table 2 RMS spot size of different field of views

Matter of high /mm	RMS radius /μm	CCD pixel size /μm
0	2.682	
0.42	2.386	3.75
0.6	3.616	

各个视场的均方根弥散斑均小于提供的 CCD 像元尺寸 3.75 μm,全部弥散斑大小也非常接近艾里斑直径,说明系统有很好的分辨率,成像质量好,这样就排除由于弥散斑过大,受杂光影响,导致分辨不清细胞的因素。

由系统能量图图 11 可看出,能量集中度相当高,说明通过系统到达探测器的能量高,对于光学系统来说会有很清晰的成像。

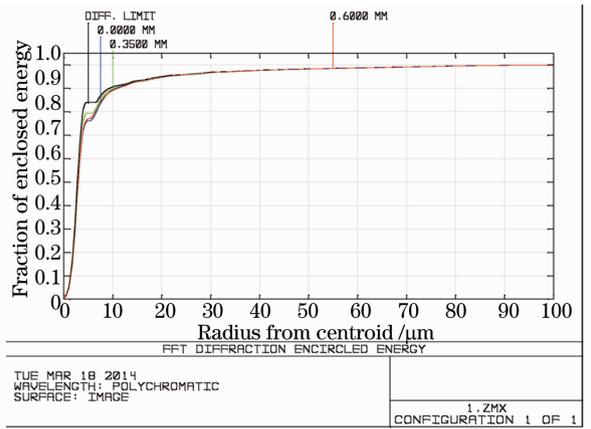


图 11 系统能量图

Fig.11 System energy diagram



图 12 “细胞工厂”显微监测装置

Fig.12 “Cell factory” microscopic monitoring device

通过上下移动调整台,移动量就是单层培养皿的高度(17 mm),配以光源照射,逐层对“细胞工厂”进行观测。图 13、14、15 为在长工作距离显微镜下观察到的“细胞工厂”中第 10、20、30 层的卵巢癌细胞。

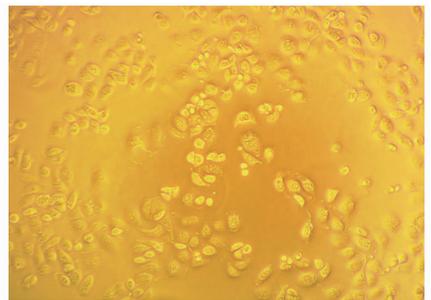


图 13 第 10 层细胞图

Fig.13 Tenth layer of cells

可看到“细胞工厂”中的各层细胞的界限分辨的很清楚,达到要求。

7 结 论

利用 ZEMAX 光学设计软件,设计了一款“细胞工厂”监测观察装置的光学系统。从设计中,分析了高分辨率视频显微镜的像差特点,通过调整优化结构

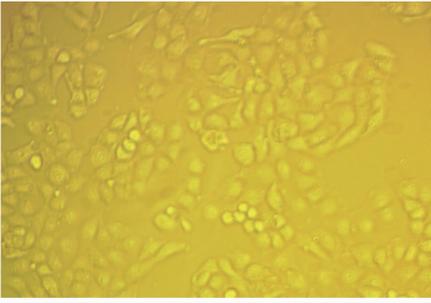


图 14 第 20 层细胞

Fig. 14 Twentieth layer of cells

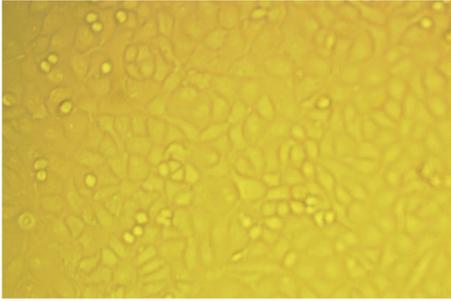


图 15 第 30 层细胞

Fig. 15 Thirtieth layer of cells

的权重,增减优化操作数,可以引导和建立一个优秀的光学结构。最终得到最小分辨距离为 $1.1\ \mu\text{m}$,可连续观察“细胞工厂”培养皿细胞的长工作距离视频显微系统。设计结果不仅成像质量优良,且结构简单紧凑,成本不高,加工可行性强,目前国内监测装置不能时时监测多层培养皿内的细胞生长状况,设计填补国内技术空白,具有很大的市场前景。

参 考 文 献

1 Liu Zhiying, Fu Yuegang, Hu Yuan, *et al.*. Reflective optical system based on annular diffraction theory[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, 38(9): 2265–2269.

刘智颖,付跃刚,胡 源,等. 基于环形衍射理论的反射式光学系统研[J]. *光子学报*, 2009, 38(9): 2265–2269.

2 Zhang Lei, Liu Zhiying, Hu Yuan, *et al.*. Improved design of Cassegrain optical system[J]. *Journal of Changchun University of Science and Technology*, 2011, 24(4): 30–32.

张 磊,刘智颖,胡 源,等. 改进型卡塞格林光学系统的设计[J]. *长春理工大学学报*, 2011, 34(4): 30–32.

3 Zhuang Zhenfeng, Wang Min, Chen Rong. Design of $0.25\times$ TV micro lens with high resolution[J]. *Optical Instruments*, 2008, 30(1): 63–65.

庄振锋,王 敏,陈 荣. $0.25\times$ 高分辨率视频显微镜设计[J]. *光学仪器*, 2008, 30(1): 63–65.

4 Liu Zhongyu, Zhang Xinting, Wu Qianqian. High resolution ultraviolet/visible wide band microscope objective[J]. *Journal of Applied Optics*, 2013, 34(4): 575–578.

刘仲禹,张欣婷,吴倩倩. 高分辨率紫外/可见宽波段显微镜设计[J]. *应用光学*, 2013, 34(4): 575–578.

5 Kang Yusi, Liu Weiqi, Feng Rui. A refract reflect telescope with Cooke as compensated lens[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2007, 15(3): 303–307.

康玉思,刘伟奇,冯 睿. Cook 结构补偿镜的球面折反型望远系统[J]. *光学精密工程*, 2007, 15(3): 303–307.

6 Yu Daoyin, Tan Hengying. *Engineering Optics*[M]. Beijing: China Machine Press, 2006. 137–150.

郁道银,谈恒英. *工程光学*[M]. 北京: 机械工业出版社, 2006. 137–150.

7 Xiao Zexin. *Optical Design Engineering*[M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2003. 201–221.

萧泽新. *工程光学设计*[M]. 北京: 电子工业出版社, 2003. 201–221.

8 Yuan Xucang. *Applied Optics*[M]. Beijing: National Defense Industry Press, 1988. 166–182.

袁旭沧. *应用光学*[M]. 北京: 国防工业出版社, 1988. 166–182.

9 Liao Sheng, Shen Mangzuo. The stray radiation suppression and baffle design in Cassegrain optical system[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 1997, 24(4): 31–36.

廖 胜,沈忙作. 卡塞格林光学系统的杂光抑制和遮光罩设计[J]. *光电工程*, 1997, 24(4): 31–36.

10 Shi Guanghui. Methods preventing stray light emerged in Cassegrain systems[J]. *Optics and Precision Engineering*, 1997, 5(5): 10–16.

史光辉. 消除卡塞格林系统杂光的措施[J]. *光学精密工程*, 1997, 5(5): 10–16.

栏目编辑:韩 峰