

点探测器位置对双轴共焦显微技术的影响

江 琴 邱丽荣* 赵维谦 沙定国

(北京理工大学光电学院, 北京 100081)

摘要 点探测器的位置是决定双轴共焦显微技术层析能力的关键因素之一,理想的共焦显微成像系统要求点探测器放在光轴上并且没有离焦情况出现。通过理论和实验分析了点探测器偏离理想位置对双轴共焦显微技术的轴向响应特性造成的影响。结果表明,点探测器的微小轴向偏移对轴向响应特性造成的影响基本可以忽略,但点探测器的微小横向偏移会使轴向响应曲线沿着 z 轴方向产生一定的移动,移动量随着偏移量的增大而增大。

关键词 探测器;双轴共焦显微技术;轴向响应;轴向偏移;横向偏移

中图分类号 TN247

OCIS 120.0120 180.1790

文献标识码 A

Effect of Point Detector Position in Dual-Axes Confocal Microscopy

Jiang Qin Qiu Lirong* Zhao Weiqian Sha Dingguo

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

Abstract The position of the point detector is one of the important parameters for the optical sectioning of the dual-axes confocal microscopy, so the point detector should be correctly positioned on the axis and without defocus. The effect of the point detector position in dual-axes confocal microscopy is analyzed. The results show that the slight axial offset of the point detector brings few effects on the axial intensity response, and a slight transverse offset of the point detector can introduce a shift into the axial response curve, while the main lobe of the axial response curve in shape is almost invariant, and the shift in the axis z increases as the offset increases.

Key words detectors; dual-axes confocal microscopy; axial response; axial offset; transverse offset

1 引言

共焦显微技术因其具有独特的光学层析和高分辨成像等优势,广泛用于微电子、材料、工业精密检测、生物医学等领域。但现有的单轴共焦显微技术存在分辨力、工作距和视场大小难以兼顾的问题。增大物镜数值孔径(NA)和减小光源波长 λ 可改善共焦显微系统的分辨力,但物镜数值孔径的提高将导致工作距变短,视场变小;而 λ 的减小又受光学元件玻璃属性和被测样品属性等参数的制约。寻求实现高分辨、大视场和大工作距显微成像与探测的方法一直是光学成像领域追求的目标^[1~5]。近年来出现的双轴共焦显微技术^[3~5]可利用低数值孔径光学系统对样品进行斜照明,然后再利用低数值孔径光学系统对样品反射的载有测量信息的光束进行收集并探测,使得照明点扩散函数(PSF)和采集PSF相互制约而压缩焦体(focal volume)^[1],继而实现共焦显微物镜轴向分辨力的提高。该方法可较好地兼顾系统分辨力、工作距和视场大小,受到国内外的广泛关注。

点探测器的位置是决定共焦显微技术层析能力的关键因素之一^[6],理想的共焦显微成像系统要求点探测器放在光轴上并且没有离焦情况出现。但在实际情况中,点探测器可能会与理想位置存在偏差,相应地会对系统的成像特性造成影响。本文从理论模型出发,分析了双轴共焦显微技术中的点探测器存在偏移对系

收稿日期: 2010-03-01; 收到修改稿日期: 2010-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(60927012, 60708015), 北京理工大学优秀青年教师资助计划和博士点基金(20091101110018)资助课题。

作者简介: 江 琴(1982—),女,博士研究生,主要从事光电测试技术方面的研究。E-mail: eleanore1982@qq.com

导师简介: 赵维谦(1966—),男,教授,博士生导师,主要从事光电测试技术与仪器等方面的研究。E-mail: zqw669@126.com

* 通信联系人。E-mail: qiulirong1@bit.edu.cn

统轴向响应特性造成的影响。

2 双轴共焦显微技术的系统点扩散函数

双轴共焦显微技术的光路示意图如图 1 所示,照明透镜 IL 和采集透镜 CL 所在的光轴与被测样品法线方向 (z 轴) 的夹角均为 θ 。 (x, y, z) , (x_i, y_i, z_i) 和 (x_c, y_c, z_c) 分别为双轴系统、IL 和 CL 在样品空间的坐标, (x_d, y_d, z_d) 为 CL 在探测空间的坐标。由图 1 可得,3 个坐标系之间的变换关系为^[4]

$$\begin{aligned} x_i &= x \cos \theta - z \sin \theta, & x_c &= x \cos \theta + z \sin \theta, \\ y_i &= y, & y_c &= y, \\ z_i &= x \sin \theta + z \cos \theta, & z_c &= -x \sin \theta + z \cos \theta. \end{aligned} \quad (1)$$

设光源波长为 λ , 当点探测器位于理想位置时,照明 PSF 和采集 PSF 分别为^[7]

$$h_i(x_i, y_i, z_i) = \iint_{-\infty}^{+\infty} P_i(x_{ip}, y_{ip}) \exp\left[\frac{i u_i}{2}(x_{ip}^2 + y_{ip}^2)\right] \exp[i(v_{ix} x_{ip} + v_{iy} y_{ip})] dx_{ip} dy_{ip}, \quad (2)$$

$$h_c(x_c, y_c, z_c) = \iint_{-\infty}^{+\infty} P_c(x_{cp}, y_{cp}) \exp\left[\frac{i u_c}{2}(x_{cp}^2 + y_{cp}^2)\right] \exp[i(v_{cx} x_{cp} + v_{cy} y_{cp})] dx_{cp} dy_{cp}, \quad (3)$$

式中 $P_i(x_{ip}, y_{ip})$ 和 $P_c(x_{cp}, y_{cp})$ 分别为 IL 和 CL 的光瞳函数, $v_{ix} = 2\pi x_i \sin \alpha_i / \lambda$, $v_{iy} = 2\pi y_i \sin \alpha_i / \lambda$ 和 $u_i = \frac{8\pi z_i \sin^2(\alpha_i/2)}{\lambda}$ 为 IL 在样品空间的归一化光学坐标, $v_{cx} = \frac{2\pi x_c \sin \alpha_c}{\lambda}$, $v_{cy} = \frac{2\pi y_c \sin \alpha_c}{\lambda}$ 和 $u_c = \frac{8\pi z_c \sin^2(\alpha_c/2)}{\lambda}$ 为 CL 在样品空间的归一化光学坐标, $\sin \alpha_i$ 和 $\sin \alpha_c$ 为 IL 和 CL 在样品空间的数值孔径。理想情况下, (2), (3) 式可简化为

$$h_i(x_i, y_i, z_i) = \int_0^1 2\pi \rho_i J_0(\rho_i v_i) \exp\left(\frac{i u_i \rho_i^2}{2}\right) d\rho_i, \quad (4)$$

$$h_c(x_c, y_c, z_c) = \int_0^1 2\pi \rho_c J_0(\rho_c v_c) \exp\left(\frac{i u_c \rho_c^2}{2}\right) d\rho_c, \quad (5)$$

式中 ρ_i 和 ρ_c 为 IL 和 CL 的归一化径向坐标, $v_i^2 = v_{ix}^2 + v_{iy}^2$, $v_c^2 = v_{cx}^2 + v_{cy}^2$ 。则理想情况下的双轴共焦显微系统的强度响应函数为

$$I_{\text{dual}}(x, y, z) = |h_i(x_i, y_i, z_i) \times h_c(x_c, y_c, z_c)|^2. \quad (6)$$

当点探测器存在一个微小偏移时,设偏移后的点探测器所在位置为 (x_d, y_d, z_d) , 采集 PSF 应该写成

$$\begin{aligned} h_c(x_c, y_c, z_c) &= \iint_{-\infty}^{+\infty} P_c(x_{cp}, y_{cp}) \exp\left[\frac{i u_c}{2}(x_{cp}^2 + y_{cp}^2)\right] \times \\ &\exp\left[\frac{i u_d}{2}(x_{cp}^2 + y_{cp}^2)\right] \exp\{i[(v_{cx} + v_{dx})x_{cp} + (v_{cy} + v_{dy})y_{cp}]\} dx_{cp} dy_{cp}, \end{aligned} \quad (7)$$

式中 $v_{dx} = 2\pi x_d \sin \alpha_d / \lambda$, $v_{dy} = 2\pi y_d \sin \alpha_d / \lambda$ 和 $u_d = 8\pi z_d \sin^2(\alpha_d/2) / \lambda$ 为带偏移量的点探测器的归一化光学坐标。 $\sin \alpha_d$ 为 CL 在探测器空间的数值孔径。由于双轴结构只对 z 和 x 方向产生影响^[4], 因此只讨论点探测器在轴向 (z_d 方向) 和横向 (x_d 方向) 的偏移。

3 点探测器存在偏移对系统轴向响应造成的影响

3.1 z_d 方向的轴向偏移

当点探测器在沿着采集光轴 z_d 方向存在微小轴向偏移时, $x_d = y_d = 0, z_d \neq 0$, (7) 式可写成

$$h_c(x_c, y_c, z_c, u_d) = \int_0^1 2\pi \rho_c J_0(\rho_c v_c) \exp\left[\frac{i(u_c + u_d)\rho_c^2}{2}\right] d\rho_c. \quad (8)$$

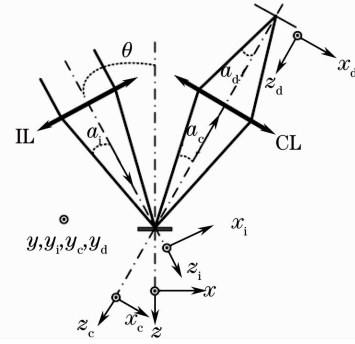


图 1 双轴共焦显微技术原理示意图

Fig. 1 Principle of dual-axes confocal microscopy

结合(1)式和(4)式,系统的轴向响应($x=y=0$)为

$$I(0,0,z,u_d) = \left| \left[\int_0^1 2\pi\rho_i J_0(\rho_i v_i) \exp\left(\frac{i u_i \rho_i^2}{2}\right) d\rho_i \right] \left\{ \int_0^1 2\pi\rho_c J_0(\rho_c v_c) \exp\left[\frac{i(u_c + u_d)\rho_c^2}{2}\right] d\rho_c \right\} \right|^2. \quad (9)$$

令系统的 $\lambda=632.8\text{ nm}$, $\theta=45^\circ$,IL和CL的 $NA=0.11$,经分析与仿真发现,点探测器存在微小轴向偏移时,轴向响应曲线的形状基本不变,响应峰值的微小偏移基本可以忽略,如图2所示。该特性说明点探测器的微小轴向偏移对双轴共焦显微系统的轴向响应造成的影响可忽略,该特性对实际光路调整很有利。

3.2 x_d 方向的横向偏移

当点探测器在CL焦面上偏离焦点存在 x_d 方向的横向偏移时, $y_d=z_d=0$ 。(7)式可写成

$$h_c(x_c, y_c, z_c, v_{dx}) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} P_c(x_{cp}, y_{cp}) \exp\left[\frac{i u_c}{2}(x_{cp}^2 + y_{cp}^2)\right] \times \exp\{i[(v_{cx} + v_{dx})x_{cp} + v_{cy}y_{cp}]\} dx_{cp} dy_{cp}, \quad (10)$$

则此时系统轴向响应为

$$I(0,0,z,v_{dx}) = \left| \left[\int_0^1 2\pi\rho_i J_0(\rho_i v_i) \exp\left(\frac{i u_i \rho_i^2}{2}\right) d\rho_i \right] \times \left\{ \int_{-1}^{+1} \exp\left[\frac{i u_c}{2}(x_{cp}^2 + y_{cp}^2)\right] \exp\{i[(v_{cx} + v_{dx})x_{cp}]\} dx_{cp} dy_{cp} \right\} \right|^2. \quad (11)$$

令点探测器的归一化横向偏移量 v_{dx} 分别为 -2.4 , -1.8 , 0 和 1.8 ,其对应的仿真轴向强度响应特性曲线如图3所示。从图3可以看出,当点探测器存在微小横向偏移时,所对应的轴向响应特性曲线相对于与无偏移时的特性曲线($v_{dx}=0$)产生一个移动,而曲线主瓣的形状基本不变。随着偏移量的增大,沿 z 轴方向产生的移动随之增大。而且点探测器朝 x_d 轴正方向和负方向偏移时,对系统轴向响应造成的移动是对称的。

依照图1搭建了如图4所示的实验验证系统,使用波长为 632.8 nm 的半导体激光器(Thorlabs Inc. CPS180)作为光源,反射镜作为被测样品。采用显微物镜MO,CCD探测器和计算机系统构建成为虚拟针孔探测系统^[8]。所用的CCD探测器为WATEC 902H2 Ultimate,有效像素数为 $752\text{ pixel(H)} \times 582\text{ pixel(V)}$,像素大小为 $8.6\text{ }\mu\text{m(H)} \times 8.3\text{ }\mu\text{m(V)}$,使用高精度气浮导轨系统带动反射镜进行 z 轴方向扫描,采用RENISHAW X80型激光干涉仪对反射镜的位移进行跟踪测量;照明透镜IL和采集透镜CL的数值孔径为 0.11 ,焦距为 31 mm , $\theta=45^\circ$,测量透镜 L_t 焦距为 200 mm ,显微物镜MO放大倍数为 25 倍。

如图4所示,光源发出的光通过准直扩束镜 L_c 和光阑后成为直径与照明透镜入瞳直径相等的平行光束。该平行光束被IL汇聚到反射镜表面,反射进入CL,CL出射的光束被一个测量透镜 L_t 汇聚。MO将 L_t 所汇聚的焦斑放大并成像在CCD探测器上。利用计算机软件在CCD探测器像面的不同位置设置一定半径的圆形虚拟针孔来模拟具有不同横向偏移量的点探测器,对信号进行探测。当 v_{dx} 分别为 -2.4 , -1.8 , 0 和 1.8 时,对应于本实验系统中放大后的点探测器的偏移量分别为 -44 , -33 , 0 和 33 pixel ,测得的实验数据如图5

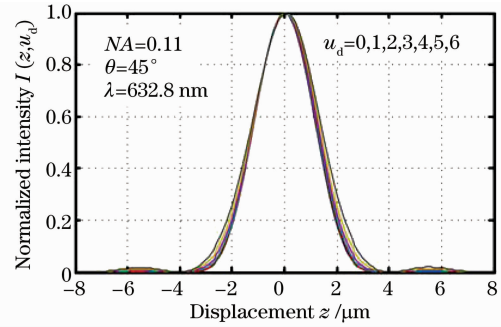


图2 点探测器轴向偏移对轴向响应的影响

Fig. 2 Effect of point detector axial offset on axial intensity response

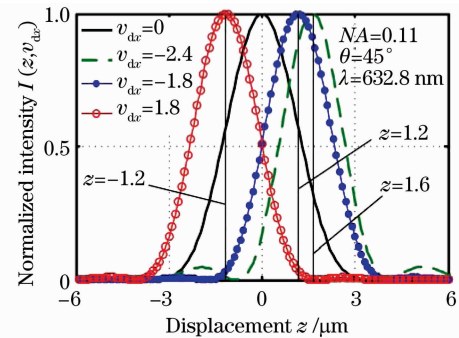


图3 点探测器横向偏移对轴向响应的影响

Fig. 3 Effect of point detector transverse offset on axial intensity response

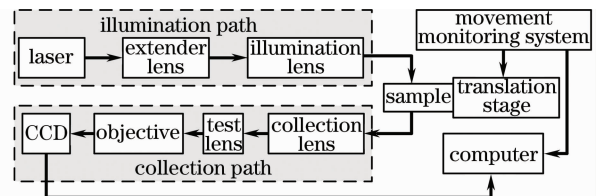


图4 实验光路

Fig. 4 Experimental setup

所示。

由图 5 可见,实验结果与仿真结果相符,证明了点探测器的微小横向偏移可使双轴共焦显微技术轴向响应曲线产生移动。

5 结 论

通过理论和实验对双轴共焦显微技术中点探测器的微小偏移给系统轴向响应特性带来的影响进行了分析和验证。当点探测器存在微小轴向偏移时,轴向响应曲线形状基本不变,响应峰值只存在极微小的偏移,对系统轴向响应造成的影响基本可以忽略。点探测器存在微小横向偏移,会使得轴向响应曲线产生一定移动。因此在实际使用双轴共焦显微系统时,要格外注意防止点探测器产生横向偏移。但是,点探测器横向偏移给双轴共焦显微系统的轴向响应带来移动的这一特性同时也为科研工作者提供了一种新的研究思路,使得双轴共焦显微技术与差动探测技术^[9]的结合成为可能,为后续研究工作提供了基础。

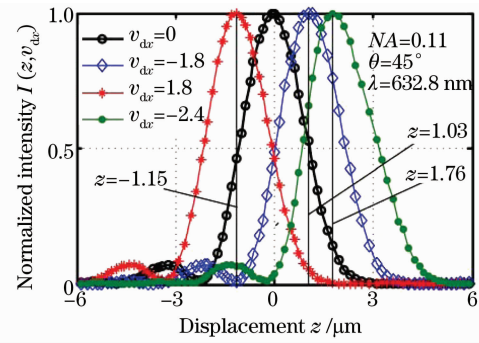


图 5 实验结果

Fig. 5 Experimental result

参 考 文 献

- 1 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**(5-6): 536~547
- 2 R. H. Webb, F. Rogomentich. Confocal microscope with large field and working distance [J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(12): 4870~4875
- 3 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
- 4 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
- 5 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
- 6 S. Kimura, T. Wilson. Effect of axial pinhole displacement in confocal microscopes [J]. *Appl. Opt.*, 1993, **32**(13): 2257~2261
- 7 Gu Min. Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes [M]. Wang Guiying Transl. Beijing: New Times Press, 2000. 14~78
顾 敏. 共焦显微技术的三维成像原理 [M]. 王桂英等译. 北京: 新时代出版社, 2000. 14~78
- 8 Tian Werjian, Ding Zhihua, Gu Lurong *et al.*. A confocal method for measuring whole-field three-dimensional surface topography [J]. *Acta Optica Sinica*, 1998, **18**(6): 757~761
田维坚, 丁志华, 郭履容等. 一种全场三维共焦检测的新方法 [J]. 光学学报, 1998, **18**(6): 757~761
- 9 W. Q. Zhao, J. B. Tan, L. R. Qiu. Bipolar absolute differential confocal approach to higher spatial resolution [J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(21): 5013~5021