

# 三层介质中激光扫描共聚焦显微镜的模型

肖 昀<sup>1,2,3</sup> 张运海<sup>1,2</sup> 武晓东<sup>1,2</sup> 檀慧明<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

<sup>3</sup>中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033

**摘要** 建立了一种激光扫描共聚焦显微镜三层介质中点扩展函数的计算模型。在 Hammoum 分式的基础上得到三层介质中的理论公式, 对比分析探测光路中的偶极子振动方向对点扩展函数的影响以及各种点扩展函数, 讨论针孔对点扩展函数、收集的能量和信噪比的影响。计算表明, 振动方向平均化的偶极子的探测点扩展函数优于沿  $x$  轴、 $z$  轴振动的偶极子的探测点扩展函数; 综合点扩展函数小于照明和探测点扩展函数, 且针孔越小, 经过针孔过滤后的综合点扩展函数更小; 方形针孔和圆形针孔的收集能量曲线类似, 但方形针孔的曲线靠右, 圆形针孔的信噪比曲线总体上优于方形针孔的信噪比曲线。

**关键词** 医用光学; 共聚焦显微镜; 点扩展函数; 偶极子; 针孔; 信噪比

**中图分类号** O439 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP51.041701

## Model of Laser Scanning Confocal Microscopy for Three Media

Xiao Yun<sup>1,2,3</sup> Zhang Yunhai<sup>1,2</sup> Wu Xiaodong<sup>1,2</sup> Tan Huiming<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215613, China

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

<sup>3</sup>Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

**Abstract** A model for laser scanning confocal microscopy with three media is given to calculate the point spread functions. (PSFs) According to Hammoum's representations, we obtain the representations for three media. The effect of the dipole orientation on the PSFs is discussed. Several PSFs are compared. Then we analyze the effects of the pinhole on the PSFs, the energy collected and the signal to noise ratio. Calculations show that the detection PSF for the dipole averaged over all orientations is better than those for the dipoles along the  $x$  axis and the  $z$  axis. The total is smaller than the illumination PSF and the detection PSF. The total PSF after the pinhole diminishes as the pinhole decreases. The curves of the energy collected for the circular pinhole and the square pinhole are similar, but the signal to noise ratio for the circular pinhole is better than that for the square pinhole.

**Key words** medical optics; confocal microscopy; point spread function; dipole; pinhole; signal-to-noise ratio

**OCIS codes** 170.1790; 350.5730; 120.4820; 120.1880

## 1 引言

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是研究微细结构的有效技术手段, 在生物医学<sup>[1-4]</sup>和工业检测<sup>[5-6]</sup>领域得

收稿日期: 2013-09-11; 收到修改稿日期: 2013-12-06; 网络出版日期: 2014-03-14

基金项目: 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破项目(Y052031205)、苏州市应用基础研究计划(SYG201324)

作者简介: 肖 昀(1988—), 男, 博士研究生, 主要从事激光共聚焦显微镜成像技术方面的研究。

E-mail: xiaoy@sibet.ac.cn

导师简介: 张运海(1975—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事超分辨显微光学成像技术方面的研究。

E-mail: zhangyunhaiguan8@163.com(通信联系人)

到了广泛应用。LSCM采用激光作光源,并在组织样品处形成一个很小的光斑,即照明点扩展函数(PSF);组织中的点光源经过探测光路在探测面上形成一个光斑,即探测PSF;激光照射在组织上,组织中的荧光物质被激发出荧光,荧光经过探测光路在探测面上形成一个光斑,即总PSF。总PSF是照明PSF和探测PSF的乘积,再经过探测透镜后焦面上的针孔滤波,由探测器件收集,最后对数据进行图像处理,得到二维或三维共聚焦图像。探测器得到的最终信号是一个复杂的函数,它包括了激光波长、激光偏振态、物镜的数值孔径、光路的放大倍数、非相干探测的针孔半径、折射率不匹配以及焦点到样品表面的距离等参数。

有关共聚焦显微镜探测PSF的研究工作已有很多。1999年,Higdon等<sup>[7]</sup>给出了大孔径多光子荧光扫描光学显微镜的成像性质;2000年,Török<sup>[8]</sup>提出了偶极子波在介质界面的传播;2003年,Haerberle等<sup>[9]</sup>描述了穿过半无限层介质的光学显微镜探测PSF;2008年,Török等<sup>[10]</sup>描述了相干光学显微镜中的高数值孔径矢量成像。这些研究工作有的是假设介质中的偶极子到第一层界面的距离远远大于光波长,忽略了偶极子的倏逝波影响,有的是通过近似来描述PSF,它们仅对一些特殊的情形有效。除此之外,还有人用几何光学来描述PSF<sup>[11]</sup>,但这种方法缺少一些重要参数对PSF的影响。Hammoum等<sup>[12]</sup>利用角谱理论来描述偶极子的散射光在两层介质中的传播,包含了偶极子的倏逝波影响,也不存在PSF近似。

本文在Hammoum成果的基础上给出了三种介质中散射光的探测PSF模型,并考虑了共聚焦显微镜中所有的重要参数。首先给出了三种介质中的照明和探测PSF的理论计算,然后对不同振动方向偶极子的探测PSF进行比较分析,接着给出了针孔对共聚焦显微镜中PSF的影响以及针孔对收集的能量、信噪比(SNR)的影响,最后得出研究的结论。

## 2 理 论

### 2.1 照明 PSF

建立坐标系  $O-xyz$ ,  $z$  轴正方向垂于直纸面向外,如图1(a)所示。一个点光源位于  $z$  轴负方向无穷远处,经过物镜聚焦。当物镜处于自由空间时,点光源的焦点位于坐标原点  $O$  处,称为高斯焦点。当光线经过三种介质会聚时,由于三种介质折射率不匹配会导致实际焦点偏离高斯焦点,如图1(a)中,实际焦点为点  $D$ 。那么实际焦点附近的点  $Q$  的电场可表示为<sup>[13-14]</sup>

$$\begin{cases} e_{\text{ill},x} = -iK[A^+ I_{\text{ill}}^{(2)} \cos 2\phi_Q + B I_{\text{ill}}^{(2)} \sin 2\phi_Q + A I_{\text{ill}}^{(0)}] \\ e_{\text{ill},y} = -iK[A^+ I_{\text{ill}}^{(2)} \sin 2\phi_Q - B I_{\text{ill}}^{(2)} \cos 2\phi_Q + B I_{\text{ill}}^{(0)}], \\ e_{\text{ill},z} = -2iK[A^+ I_{\text{ill}}^{(0)} \sin \phi_Q + B I_{\text{ill}}^{(0)} \sin 2\phi_Q] \end{cases} \quad (1)$$

式中  $K = \frac{k_1 f_1 l_0}{2} = \frac{\pi n_1 f_1 l_0}{\lambda}$ ,  $f_1$  为物镜在真空中的焦距,  $l_0$  为振幅因子,  $\lambda$  为入射光波长,  $A^+$  和  $B$  为巴比涅-索累补偿器的广义高斯矩阵<sup>[14]</sup>,  $I_{\text{ill}}^{(0)}$ 、 $I_{\text{ill}}^{(1)}$ 、 $I_{\text{ill}}^{(2)}$  分别为<sup>[14]</sup>

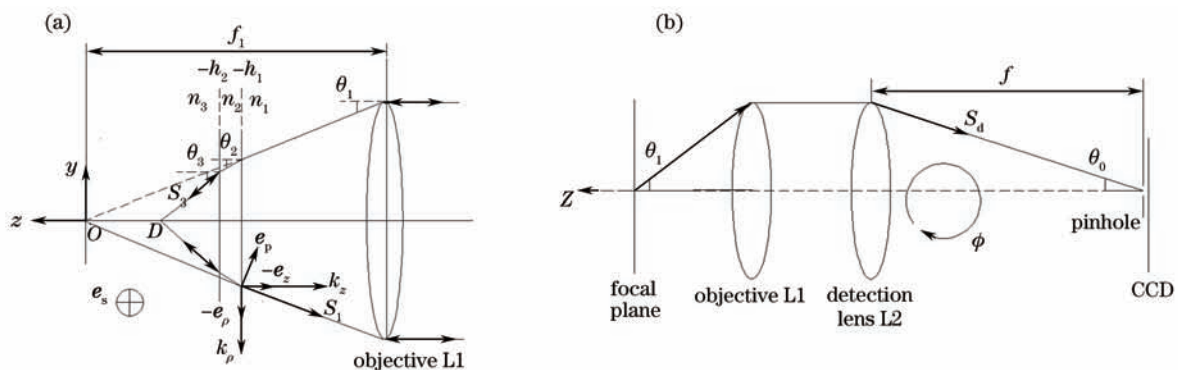


图1 共聚焦显微镜的简单示意图。(a)第三种介质中  $D$  处偶极子的散射波被物镜收集的示意图;(b)带有针孔和探测器的共聚焦成像光路示意图

Fig. 1 Simplified schematic of the confocal microscope. (a) Labeling scheme for the scattered waves of a dipole near the point  $D$  in the third medium; (b) schematic of the imaging geometry of the pinhole and the detector

$$\begin{cases} I_{\text{ill}}^{(0)} = \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_0(k_1 \sin \theta_1 r_Q \sin \theta_Q) (T_{\text{s,ill}} + T_{\text{p,ill}} \cos \theta_3) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] \exp(ik_3 z_Q \cos \theta_3) \sin \theta_1 d\theta_1 \\ I_{\text{ill}}^{(1)} = \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_1(k_1 \sin \theta_1 r_Q \sin \theta_Q) T_{\text{p,ill}} \sin \theta_3 \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] \exp(ik_3 z_Q \cos \theta_3) \sin \theta_1 d\theta_1 \\ I_{\text{ill}}^{(2)} = \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_2(k_1 \sin \theta_1 r_Q \sin \theta_Q) (T_{\text{s,ill}} - T_{\text{p,ill}} \cos \theta_3) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] \exp(ik_3 z_Q \cos \theta_3) \sin \theta_1 d\theta_1 \end{cases}, \quad (2)$$

式中  $A_{\text{ill}} = \exp(-2 \sin^2 \theta_1 / NA^2) \cos^{1/2} \theta_1$  为切趾函数,  $NA$  为物镜的数值孔径,  $\theta_1$  为介质  $i$  中光线与  $z$  轴的夹角,  $J_n$  为  $n$  阶贝塞尔函数,  $\mathbf{r}_Q$  为点  $Q$  的位置向量,  $\theta_Q$  为  $\mathbf{r}_Q$  与  $z$  轴的夹角,  $\mathbf{r}_Q$  在  $x$ - $y$  平面内与  $x$  轴的夹角为  $\phi_Q$ ,  $z_Q$  为点  $Q$  的  $z$  轴位置,  $\Phi$  为初始像差函数,  $\Phi^*$  为与物镜有关的初始像差函数,  $T$  为三层介质的透射系数。

## 2.2 探测 PSF

在显微镜的成像光路中, Török<sup>[6]</sup> 利用偶极子波描述了光在介质中的传播, 但他的假设前提是偶极子与第一层界面的距离远远大于光波长, 忽略了倏逝波的影响。而近期的近场光学研究表明倏逝波的作用很重要。Hammoum 等<sup>[12]</sup> 把偶极子波分解成角谱形式, 包含了近场光学的影响, 给出了偶极子波穿过一层界面的传播表达式。在此基础上, 我们采用柱坐标系  $(\rho, -s, z)$  表示偶极子波穿过界面前和穿过界面后的电场强度, 在偶极子波穿过界面时, 采用光的  $\mathbf{p}$  分量和  $\mathbf{s}$  分量描述光传播。那么偶极子波穿过两层界面后的电场强度可表示为<sup>[12]</sup>:

$$\mathbf{E}_{\text{det},1} = \begin{bmatrix} E_{\text{det},1p} \\ E_{\text{det},1s} \\ E_{\text{det},1z} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\cos \theta_1 t_{21,p} t_{32,p} \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_p \\ t_{21,s} t_{32,s} \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_s \\ -\sin \theta_1 t_{21,p} t_{32,p} \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_p \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} t_{21,p} t_{32,p} (\cos \theta_1 \cos \theta_3 \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_p + \cos \theta_1 \sin \theta_3 \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_z) \\ t_{21,s} t_{32,s} \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_s \\ t_{21,p} t_{32,p} (\sin \theta_1 \cos \theta_3 \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_p + \sin \theta_1 \sin \theta_3 \mathbf{p} \cdot \mathbf{e}_z) \end{bmatrix}, \quad (3)$$

式中  $\mathbf{p}$  为偶极子极距,  $\mathbf{e}_p$ 、 $\mathbf{e}_s$  为光  $\mathbf{p}$  分量、 $\mathbf{s}$  分量的单位向量,  $\mathbf{e}_p$ 、 $\mathbf{e}_z$  分别为柱坐标中  $\rho$  方向、 $z$  方向的单位向量。

利用广义高斯矩阵, 光经过物镜  $L_1$  和探测透镜  $L_2$  的电场强度可以表示为<sup>[12]</sup>

$$\mathbf{E}_{\text{det},0}^{(x,y,z)} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{R} \cdot \mathbf{L}_2 \cdot \mathbf{L}_1 \cdot \mathbf{E}_{\text{det},1}^{(\rho,s,z)}, \quad (4)$$

式中  $C$  为成像光路中的切趾函数, 表示为  $C = \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2}$ ,  $L_1$  和  $L_2$  分别为光束在物镜  $L_1$  和探测透镜  $L_2$  中的传播矩阵,  $\mathbf{R}$  为坐标系  $(\rho, -s, z)$  转换成坐标系  $(x, y, z)$  的转换矩阵。根据 Richards-Wolf 积分公式<sup>[15]</sup>, 成像光路中的探测电场可表示为

$$\mathbf{e}_{\text{det}} = \frac{ik_0}{2\pi} \int_0^{\alpha_0} \int_0^{2\pi} \mathbf{E}_{\text{det},0}^{(x,y,z)} \sin \theta_0 \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] \exp[ik_0[r_d \sin \theta_0 \cos(\phi - \phi_d) - z_d \cos \theta_0]] d\phi d\theta_0, \quad (5)$$

式中  $\alpha_0$  为探测透镜后像方孔径角, 像面焦点附近的点  $Q_d$  的  $(x, y, z)$  坐标为  $(r_d \sin \theta_d \cos \phi_d, r_d \sin \theta_d \sin \phi_d, r_d \cos \theta_d = z_d)$ 。对  $\phi$  积分, 并把电场表达式写成  $xyz$  分量形式:

$$\begin{cases} e_{\text{det},x} = \frac{ik_0}{2} [p_x I_{\text{det}}^{(0)} + 2ip_z I_{\text{det}}^{(1)} \cos \phi_d + I_{\text{det}}^{(2)} (p_x \cos 2\phi_d + p_y \sin 2\phi_d)] \\ e_{\text{det},y} = \frac{ik_0}{2} [p_y I_{\text{det}}^{(0)} + 2ip_z I_{\text{det}}^{(1)} \sin \phi_d + I_{\text{det}}^{(2)} (p_x \sin 2\phi_d - p_y \cos 2\phi_d)] \\ e_{\text{det},z} = ik_0 [iI_{\text{det}}^{(3)} (p_x \cos \phi_d + p_y \sin \phi_d) + p_z I_{\text{det}}^{(4)}] \end{cases}, \quad (6)$$

式中  $p_x$ 、 $p_y$ 、 $p_z$  分别为偶极子极距  $\mathbf{p}$  在  $x$  轴、 $y$  轴、 $z$  轴的分量,  $I_{\text{det}}^{(0)}$ 、 $I_{\text{det}}^{(1)}$ 、 $I_{\text{det}}^{(2)}$ 、 $I_{\text{det}}^{(3)}$ 、 $I_{\text{det}}^{(4)}$  分别为

$$\begin{aligned} I_{\text{det}}^{(0)} &= \int_0^{\alpha_0} \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2} (t_{21,s} t_{32,s} + t_{21,p} t_{32,p} \cos \theta_3 \cos \theta_0) \sin \theta_0 J_0(k_0 \sin \theta_0 r_d \sin \theta_d) \exp(-ik_0 z_d \cos \theta_0) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] d\theta_0 \\ I_{\text{det}}^{(1)} &= \int_0^{\alpha_0} \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2} t_{21,p} t_{32,p} \sin \theta_3 \cos \theta_0 \sin \theta_0 J_1(k_0 \sin \theta_0 r_d \sin \theta_d) \exp(-ik_0 z_d \cos \theta_0) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] d\theta_0 \\ I_{\text{det}}^{(2)} &= \int_0^{\alpha_0} \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2} (t_{21,s} t_{32,s} - t_{21,p} t_{32,p} \cos \theta_3 \cos \theta_0) \sin \theta_0 J_2(k_0 \sin \theta_0 r_d \sin \theta_d) \exp(-ik_0 z_d \cos \theta_0) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] d\theta_0 \end{aligned}$$

$$I_{\text{det}}^{(3)} = \int_0^{\alpha_0} \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2} \frac{t_{21,p} t_{32,p}}{2} \cos \theta_3 \sin 2\theta_1 \sin 2\theta_0 J_1(k_0 \sin \theta_0 r_d \sin \theta_d) \exp(-ik_0 z_d \cos \theta_0) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] d\theta_0, \quad (7)$$

$$I_{\text{det}}^{(4)} = \int_0^{\alpha_0} \left( \frac{\cos \theta_0}{\cos \theta_1} \right)^{1/2} \frac{t_{21,p} t_{32,p}}{2} \sin \theta_3 \sin 2\theta_1 \sin 2\theta_0 J_1(k_0 \sin \theta_0 r_d \sin \theta_d) \exp(-ik_0 z_d \cos \theta_0) \exp[ik_0(\Phi - \Phi^*)] d\theta_0$$

当加入针孔后,最后探测到的光强为

$$I_{\text{det}} = \iint_D |\mathbf{e}_{\text{det}}|^2 S_D dD = \int_0^R \int_0^{2\pi} |\mathbf{e}_{\text{det}}|^2 f(\rho_d) \rho_d d\rho_d d\phi_d, \quad (8)$$

式中  $S_D$  和  $f(\rho_d)$  为探测器的灵敏度函数,  $D$  为探测器的接收面积,  $R$  为探测器半径,  $\rho_d$  为探测平面径向坐标。

### 3 计算分析及讨论

#### 3.1 探测 PSF

采用的物镜放大倍率为 100 倍、 $NA$  为 1.3, 三种介质的折射率分别为  $n_1 = 1.518$ 、 $n_2 = 1.515$ 、 $n_3 = 1.33$ , 偶极子发射波长为 520 nm。图 2 为位于  $d=0$  处(即焦面和介质  $n_3$ 、 $n_2$  间的界面重合)的偶极子散射发出的信号穿过三层介质后的探测 PSF。这些偶极子的振动方向都是固定的, 并被沿  $x$  轴振动的入射光激发。图 2 给出了沿  $y$  轴振动和沿  $z$  轴振动的偶极子所形成的探测 PSF。从图中可以看出, 两种偶极子的探测 PSF 的  $E_z$  分量小于  $E_x$  和  $E_y$ , 影响较小, 以至于沿  $z$  轴振动的偶极子的探测 PSF 中间暗, 沿  $y$  轴振动的偶极子的探测 PSF 中间亮; 沿  $z$  轴振动的偶极子的探测 PSF 大于沿  $y$  轴振动的偶极子的探测 PSF。从图 3 中也可以看出沿  $z$  轴振动的偶极子的探测 PSF 在  $x$  轴和  $y$  轴方向上都大于沿  $y$  轴振动的偶极子探测 PSF; 振动平均化的偶极子的探测 PSF 大于沿  $y$  轴振动的偶极子探测 PSF, 小于沿  $z$  轴振动的偶极子的探测 PSF; 沿  $z$  轴振动的偶极子和振动平均化的偶极子的探测 PSF 在  $x$  轴和  $y$  轴宽度相同, 而沿  $y$  轴振动的偶极子探测 PSF 的  $x$  轴宽度小于  $y$  轴宽度。因此振动平均化的偶极子有较好的成像质量, 以下的探测 PSF 都采用这种偶极子。

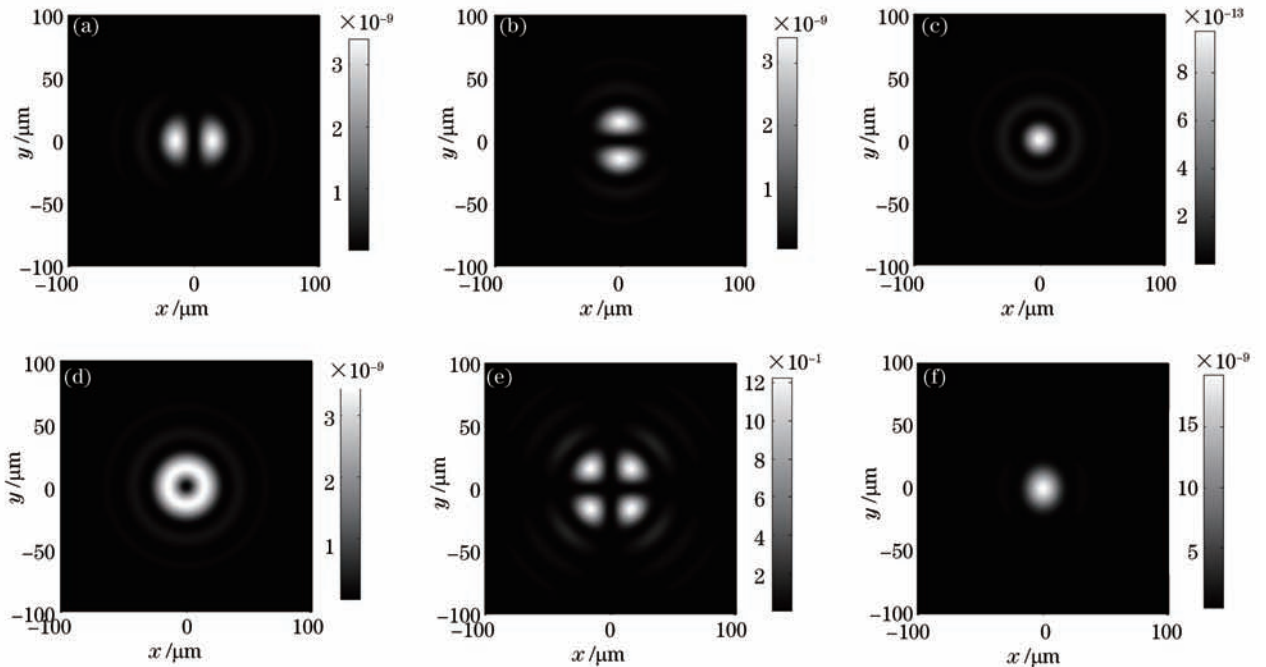


图 2 探测 PSF。(a)~(d) 沿  $z$  轴振动的偶极子探测 PSF 的  $|E_x|^2$ 、 $|E_y|^2$ 、 $|E_z|^2$  分量和  $|E|^2$ ; (e)~(h) 沿  $y$  轴振动的偶极子探测 PSF 的  $|E_x|^2$ 、 $|E_y|^2$ 、 $|E_z|^2$  分量和  $|E|^2$

Fig.2 Detection PSF. (a)~(d) Detection PSF components  $|E_x|^2$ ,  $|E_y|^2$ ,  $|E_z|^2$  and  $|E|^2$  for dipoles oriented along the  $z$  axis; (e)~(h) detection PSF components  $|E_x|^2$ ,  $|E_y|^2$ ,  $|E_z|^2$  and  $|E|^2$ , for dipoles oriented along the  $y$  axis



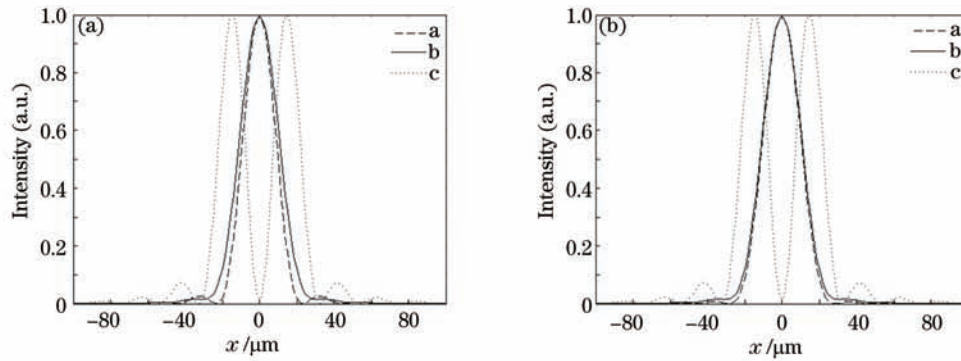


图3 横向探测 PSF 的光强分布。(a)  $x$  轴的光强分布; (b)  $y$  轴的光强分布。曲线 a~c 分别表示偶极子沿  $y$  轴振动、偶极子振动平均化和偶极子沿  $z$  轴振动

Fig.3 Intensity for the lateral detection PSF. (a) Intensity along the  $x$  axis; (b) intensity along the  $y$  axis. a~c refer to the dipoles oriented along the  $y$  axis, averaged, and along the  $z$  axis

### 3.2 针孔的影响

#### 3.2.1 针孔与 PSF

采用的激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 520 nm, 三种介质的折射率分别为  $n_1 = 1$ 、 $n_2 = 1.515$ 、 $n_3 = 1.33$ 。为了更直观地比较各种 PSF, 在探测 PSF 的计算分析中, 采用的物镜放大倍率为 1 倍、 $NA$  为 0.9。图 4 给出了共聚焦显微镜光路中的照明 PSF、探测 PSF、综合 PSF 和加入针孔后的综合 PSF。照明 PSF [图 4(a)] 光斑小于探测 PSF [图 4(b)] 光斑, 这是因为照明 PSF 的波长小于探测 PSF 的波长, 能形成更小的光斑; 综合 PSF [图 4(c)] 为照明 PSF 和探测 PSF 的乘积, 其光斑小于照明 PSF 和探测 PSF 的光斑; 加入针孔的综合 PSF [图 4(d)] 光斑更小, 其光斑大小由加入的针孔大小决定, 针孔越小, 光斑越小。还可以从 PSF 沿  $x$  轴的光强分布曲线图 (图 5) 得到这种结论。由于针孔的存在, 在焦点处只有针孔以内的区域有光通过。

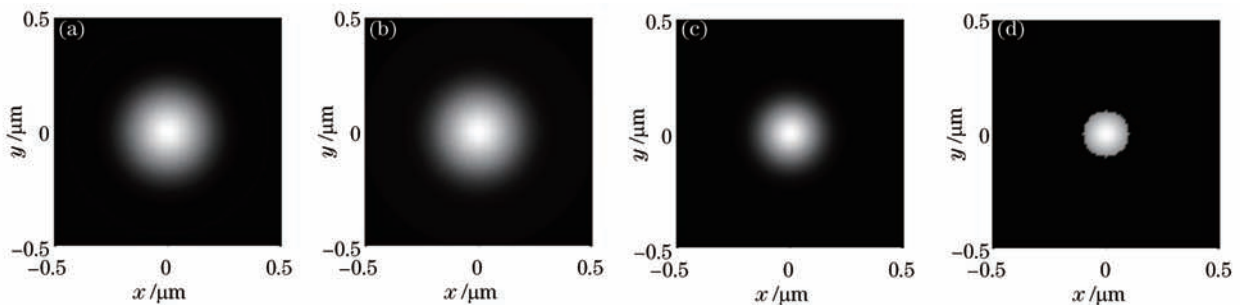


图4 各种 PSF。(a)照明 PSF; (b)探测 PSF; (c)综合 PSF; (d)加入针孔后的综合 PSF

Fig.4 PSFs. (a) Illumination PSF; (b) detection PSF; (c) total PSF; (d) total PSF with the pinhole

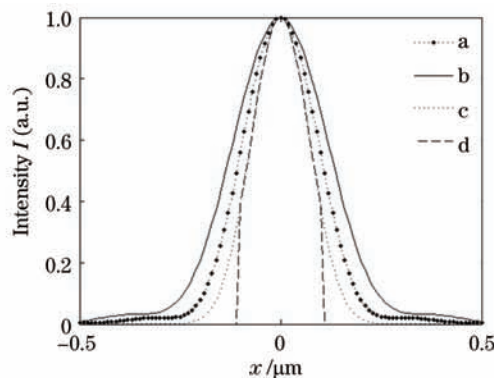


图5 PSF 在  $x$  轴的光强分布。曲线 a 为照明 PSF, 曲线 b 为探测 PSF, 曲线 c 为综合 PSF, 曲线 d 为加入针孔后的综合 PSF  
Fig.5 Intensity along the  $x$  axis. Curves a, b, c, d refer to illumination PSF, detection PSF, total PSF and total PSF with the pinhole, respectively

### 3.2.2 针孔与收集能量、信噪比

分析探测光路中针孔对收集的能量和信噪比的影响时,采用的物镜放大倍率为100倍、 $NA$ 为1.3,三种介质的折射率分别为 $n_1=1.518$ 、 $n_2=1.515$ 、 $n_3=1.33$ ,偶极子发射波长为520 nm。将方形针孔的半径定义为其宽度的一半。从图6可以看出,当两种针孔较小时,收集的能量增加较快;当针孔尺寸增加到某一值时,收集能量出现拐点,增加变慢,最终不再增加。当针孔半径相同时,方形针孔收集的能量大于圆形针孔收集的能量;方形针孔收集能量的拐点比圆形针孔收集能量的拐点出现的早。

在共聚焦显微镜中,针孔越大,收集的有效能量越多,同时噪声也会增加,影响成像质量。确定针孔大小,必须考虑针孔对信噪比的影响。信噪比可以表示为<sup>[10]</sup>

$$R_{SN} = \frac{I}{\sqrt{I+B}}, \quad \begin{matrix} B = \pi ar_d^2; \text{方形针孔} \\ B = 4ar_d^2; \text{圆形针孔} \end{matrix} \quad (9)$$

式中 $I$ 为有效光强, $B$ 为背景噪声,和针孔的面积成比例,对于方形针孔, $B = \pi ar_d^2$ , $r_d$ 为针孔宽度的一半,对于圆形针孔, $B = 4ar_d^2$ , $r_d$ 为针孔的半径, $a$ 为常数。图7给出了方形针孔和圆形针孔对信噪比的影响。随着针孔尺寸的增大,信噪比先增加,达到最大值后再减小; $a$ 越大,信噪比越大。在信噪比达到最大值前,针孔较小时,圆形针孔信噪比小于方形针孔信噪比;当针孔增加到某一值时,二者相等;此后随着针孔尺寸继续增加,圆形针孔信噪比一直大于方形针孔信噪比。当 $a=1$ 时,圆形针孔信噪比最大值的位置为 $x=16 \mu\text{m}$ ,方形针孔信噪比最大值的位置为 $x=12 \mu\text{m}$ ,为了保证信噪比大于50%,圆形针孔半径范围应为6~46  $\mu\text{m}$ ,方形针孔半径范围为2~38  $\mu\text{m}$ 。

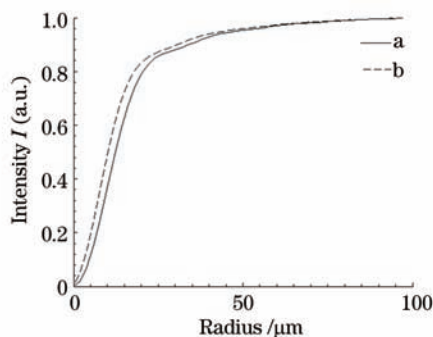


图6 收集的能量与针孔尺寸的关系。曲线a表示圆形针孔,曲线b表示方形针孔

Fig.6 Relations between the energy collected and the pinhole size. Curves a and, b refer to the circular pinhole and the square pinhole, respectively

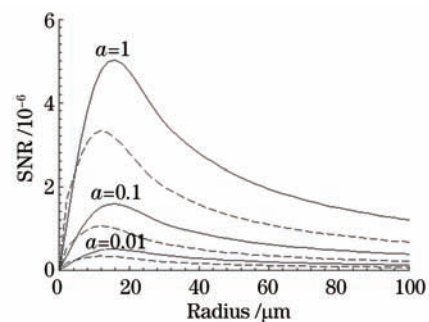


图7 信噪比与针孔的关系:实线为圆形针孔,虚线为方形针孔  
Fig.7 Relations between SNR and the pinhole size. Solid curves and dotted line refer to the circular pinhole and the square pinhole, respectively

## 4 结 论

在Hammoum探测光路PSF模型的基础上,给出了三层介质中的探测PSF模型和不同振动方向偶极子的探测PSF,比较了照明PSF、探测PSF、综合PSF和针孔滤波后的PSF,并分析了不同针孔对收集能量和信噪比的影响。通过计算分析,发现振动方向平均化的偶极子的探测PSF优于沿 $x$ 轴、 $z$ 轴振动的偶极子的探测PSF;对于收集能量曲线,方形针孔和圆形针孔类似,但方形针孔的曲线靠右;圆形针孔信噪比曲线总体上优于方形针孔信噪比曲线。本文给出了三层介质中包含各种参数的共聚焦显微镜模型,可以计算分析出共聚焦显微镜的最佳分辨率。

### 参考文献

- 1 P E Chetverikov. Confocal laser scanning microscopy technique for the study of internal genitalia and external morphology of eriophyoid mites (Acari: Eriophyoidea) [J]. Zootaxa, 2012, 3453: 56-68.
- 2 C McFadden, J Bartz, M Akselrod, *et al.*. Towards cell nucleus microdosimetry: construction of a confocal laser-scanning fluorescence microscope to readout fluorescence nuclear track detectors (FNTDs) [J]. Medical Physics,

- 2012, 39(6): 3725–3725.
- 3 T R Aguiar, C B Andre, C A G Arrais, *et al.*. Micromorphology of resin–dentin interfaces using self–adhesive and conventional resin cements: a confocal laser and scanning electron microscope analysis [J]. *International J Adhesion and Adhesives*, 2012, 38: 69–74.
  - 4 Z Ma, Q Liu, H Yang, *et al.*. Laser patterning for the study of MSC cardiogenic differentiation at the single–cell level [J]. *Light Sci Appl*, 2013, 2(5): e68.
  - 5 S H Lin, Z M Chen, S J Liu, *et al.*. Three–dimensional observation of defects in nitrogen–doped 6H–SiC crystals using a laser scanning confocal microscope [J]. *J Mater Sci*, 2012, 47(7): 3429–3434.
  - 6 R Boulesteix, A Maitre, J F Baumard, *et al.*. Quantitative characterization of pores in transparent ceramics by coupling electron microscopy and confocal laser scanning microscopy [J]. *Mater Lett*, 2010, 64(16): 1854–1857.
  - 7 P D Higdon, P Török, T Wilson. Imaging properties of high aperture multiphoton fluorescence scanning optical microscopes [J]. *J Microscopy*, 1999, 193(2): 127–141.
  - 8 P Török. Propagation of electromagnetic dipole waves through dielectric interfaces [J]. *Opt Lett*, 2000, 25(19): 1463–1465.
  - 9 O Haeberle, M Ammar, H Furukawa, *et al.*. Point spread function of optical microscopes imaging through stratified media [J]. *Opt Express*, 2003, 11(22): 2964–2969.
  - 10 P Török, P R T Munro, E E Kriezis. High numerical aperture vectorial imaging in coherent optical microscopes [J]. *Opt Express*, 2008, 16(2): 507–523.
  - 11 C Sourisseau, P Maraval. Confocal Raman microspectrometry: a vectorial electromagnetic treatment of the light focused and collected through a planar interface and its application to the study of a thin coating [J]. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57(11): 1324–1332.
  - 12 R Hammoum, S O S Hamady, M D Fontana. Generalized model for incoherent detection in confocal optical microscopy [J]. *Appl Opt*, 2010, 49(16): D96–D105.
  - 13 P Török, P Varga, G R Booker. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. I [J]. *J Opt Soc Am A*, 1995, 12(10): 2136–2144.
  - 14 M J Nasse, J C Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy [J]. *J Opt Soc Am A*, 2010, 27(2): 295–302.
  - 15 B Richards, E Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc R Soc Lond A*, 1959, 253(1274): 358–379.
  - 16 C J R Sheppard, M Gu, M Roy. Signal–to–noise ratio in confocal microscope systems [J]. *J Microscopy*, 1992, 168(3): 209–218.