

用于高密度多焦点多光子显微成像系统的时间延板设计

李亚晖 刘立新

西安电子科技大学物理与光电工程学院, 陕西 西安 710071

摘要 多焦点多光子显微(MMM)和单点扫描多光子显微相比,可显著提高光能利用率和成像速度,在生命科学研究领域具有广泛的应用前景。但现有 MMM 技术成像质量和成像速度之间存在矛盾,增加单位面积内的焦点数目可提高成像速度,但过小的焦点间距离会产生子光束串扰,从而影响纵向空间分辨率。利用 Zemax 软件模拟产生了高密度激发点阵,将传统的不小于 $6\ \mu\text{m}$ 的相邻焦点间距缩小到约 $3\ \mu\text{m}$;分析了高密度点阵激发成像产生噪声的原因;根据时间复用技术的原理设计正方形时间延板,对相邻子光束脉冲进行不同时间的延迟,从而可以消除 MMM 系统中高密度激发点阵子光束间的串扰。

关键词 光学设计;多焦点多光子显微技术;高密度激发点阵;时间复用技术;时间延板

中图分类号 O435 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.072202

Design of Time-Delaying Plate Used in High-Density Multifocal Multiphoton Microscopic Imaging System

Li Yahui Liu Lixin

School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an, Shaanxi 710071, China

Abstract Compared with single-point scanning microscopy, multifocal multiphoton microscopy (MMM) can significantly improve the light energy utilization efficiency and imaging speed. Thus it has broad application prospects in life science. Unfortunately, there exists conflicts between the image quality and imaging speed in the available MMM systems. Although increasing focus number within a unit area can increase the imaging speed, too small focus distance will produce crosstalk between adjacent beamlets that will affect the longitudinal spatial resolution. High-density excitation focus array is simulated with Zemax, the distances between adjacent focus are reduced from $6\ \mu\text{m}$ to $3\ \mu\text{m}$; the causes of noise in high-density multifocal multiphoton microscopic imaging system are analyzed; a square time-delaying plate based on the principle of time multiplexing technology is designed, which can generate different time delays between adjacent sub-pulses, therefore the crosstalk between adjacent beamlets is eliminated in high-density MMM imaging system.

Key words optical design; multifocal multiphoton microscopy; high-density excitation spot array; time multiplexing technology; time-delaying plate

OCIS codes 080.2740; 110.0180; 120.4820

1 引言

荧光显微技术已经成为生物医学领域的重要研究工具,能够对活组织样本进行高分辨率无损成像。激光扫描共焦显微和多光子激发荧光显微技术可以实现生物样品的高空间分辨率三维成像,但缺点是要对样

收稿日期: 2013-12-05; 收到修改稿日期: 2014-03-04; 网络出版日期: 2014-06-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(11204226)、陕西省自然科学基金(2014JM8324)、中央高校基本科研业务费专项资金(K5051305002, NSIY05)

作者简介: 李亚晖(1990—),女,硕士研究生,主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: 1019447473@qq.com

导师简介: 刘立新(1977—),女,博士,副教授,主要从事生物光子学及光电子技术方面的研究。

E-mail: lxliu@xidian.edu.cn(通信联系人)

品进行逐点扫描,因此成像速度慢^[1-2]。提高多光子激发荧光显微成像速度的方法有两种。1)提高光斑在样品上的扫描速度。这样图像上每一像素点的测量时间就减少了,所得成像的信噪比会下降,为了维持信噪比,需要增加荧光团浓度或增强激发光束强度等,但过高的荧光团浓度会干扰生物样品的正常功能,样品也会产生毒性。另外,由于目前大多数多光子激发显微成像系统采用如检流计振镜和共振镜等机械扫描方式,过分提高扫描速度会严重影响扫描精度。2)利用多个激发光点同时激发样品。这样,即使采用传统的机械扫描的方式如检流计振镜和Nipkow盘,成像速度也会得到显著提高,不但可以实现生物样品的实时多光子激发显微成像,还可以直接通过目镜观察,这就是多焦点多光子显微(MMM)技术^[3-7]。MMM技术利用多焦点同时激发样品以及荧光的并行探测可以大大提高成像速度和光能利用率。但是增加单位面积内并行激发的焦点数时会削弱空间分辨率,当焦点间距减小到一定程度时成像的噪声非常大,这样的成像就不具有研究价值^[3,8-9]。

本文的目的在于建立高速高分辨率的成像系统,在高密度点阵激发的条件下消除样品成像的噪声,解决焦点间距和空间分辨率之间的冲突。通过Zemax模拟符合高密度激发的激发点阵,调整MMM透镜组合的参数,使得传统的不能小于6 μm 的相邻焦点间距缩小到约3 μm ,大大提高成像速度。分析了激发阵列子光束尾部在样品内部发生干涉导致激发荧光的原因,焦点间距越小,离焦面产生的干扰荧光越严重。根据时间复用技术设计了不同厚度的玻璃阵列,使得相邻子光束脉冲不同时激发样品,这样离焦面就不会产生荧光干扰焦平面的荧光成像,实现高分辨率的成像。

2 高密度多焦点多光子显微成像系统

建立了高密度多焦点多光子显微(Hd-MMM)成像系统,如图1所示。由钛蓝宝石飞秒激光器发出的脉冲宽度约为100 fs的近红外光经扩束器(BE)扩束后照明微透镜阵列(ML),在ML的预焦平面上形成 $N \times N$ 的激发光点阵;经过中间光学系统L1、L2及二维扫描振镜,再经管镜(TL)和双色镜(DM)后到达60 \times 的油浸物镜,实现对样品的高密度点阵双光子荧光激发,荧光由显微物镜收集经DM反射后由ICCD相机成像。若要实现高密度激发点阵子光束间无串扰荧光成像,需在ML和L1之间加入时间延板(图1左侧为7 \times 7时间延板阵列,其尺寸规格与微透镜阵列ML完全一致)。

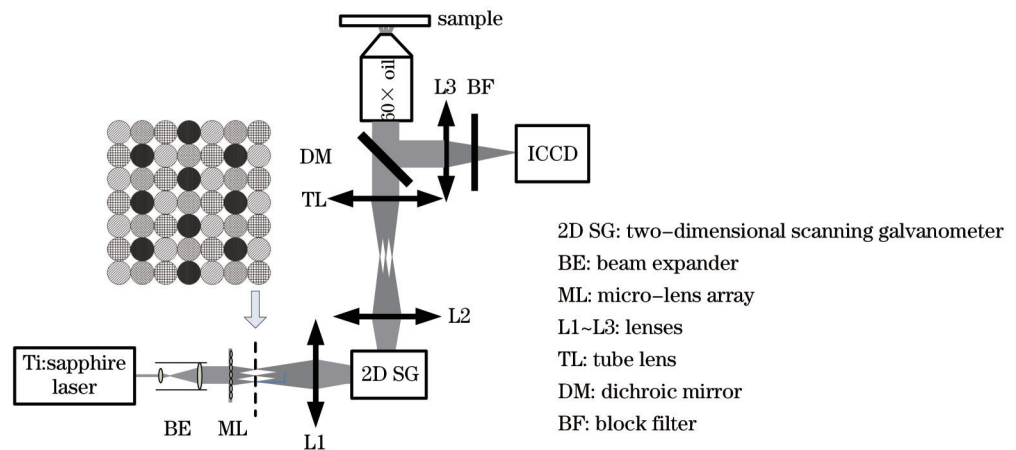


图1 高密度多焦点多光子显微成像系统

Fig.1 High-density multifocal multiphoton microscopic imaging system

这样的高密度激发点阵显微成像系统可以解决传统MMM系统成像速度慢的问题,甚至无需扫描即可一次拍照成像^[10],同时具有与单点扫描显微成像相同的高分辨率的优点。为了将这一系统量化优化,通过Zemax模拟了高密度激发点阵的产生,优化了系统透镜组合参数;分析了高密度激发点阵成像产生荧光串扰的原因;根据时分复用技术原理设计出可以应用在该成像系统中的时间延板,加入时间延板的Hd-MMM系统在理论上可以实现高速高分辨率成像。

3 Hd-MMM 系统的优化

3.1 高密度激发点阵的模拟

现有的多焦点多光子显微成像技术在不影响纵向分辨率的情况下可以产生焦点间距大于等于 $6\ \mu\text{m}$ 的焦点阵列^[9-6,11-12]。当焦点间距小于 7λ ($6\ \mu\text{m}$) 时,由于激发子光束间的串扰,荧光成像的纵向分辨率会显著下降,这样就会导致图像模糊。现有的 MMM 系统若得到符合荧光成像分辨率要求的样品图案,照射在样品上的焦点阵列需要对样品进行多次扫描。成像速度与扫描次数和焦点间距有关,在保持成像分辨率相同的情况下,焦点间距越小,扫描次数越少,成像速度越快。为了进一步提高 MMM 系统的成像速度,设计了焦点间距为 $3\ \mu\text{m}$ 的高密度多焦点多光子显微成像系统(Hd-MMM)。

利用 Zemax 软件模拟 Hd-MMM 系统(如图 1 所示)中管镜 TL 之前的透镜组合,并得到符合要求的管镜前焦平面处的焦点阵列图样。图 2 为 Zemax 模拟的管镜 TL 之前的透镜组合,由微透镜阵列和两个凸透镜组成,这样就可以在管镜前焦平面处形成如图 3(a)所示的焦点阵列,图 3(b)是该焦点阵列的光线扇形图。光线扇形图是衡量成像像差大小的工具,光线扇形图曲线的斜率越接近于 x 轴,像差就越小。由图 3(b)可知焦点阵列中每个点的光线扇曲线都几乎与 x 轴平行,说明在管镜焦平面处产生的焦点阵列的像差很小。为了让这个焦点阵列在通过管镜后平行于照明物镜,最终在样品上形成相邻焦点间距约为 $3\ \mu\text{m}$ 的高密度激发点阵,设置图 2 透镜组合的参数如图 4 所示。

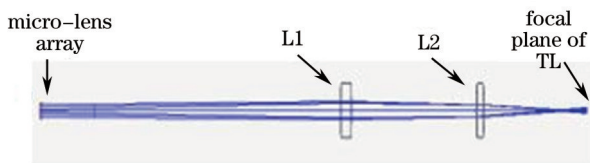


图 2 Hd-MMM 系统中管镜前的透镜组合

Fig.2 Lens combination before TL in Hd-MMM system

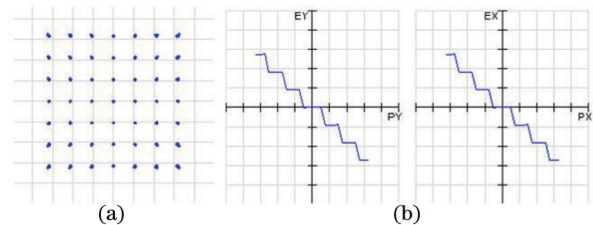


图 3 管镜前焦平面处(a)焦点阵列及(b)光线扇形图

Fig.3 Focal plane of TL (a) focus array and (b) ray fan plot

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Semi-Diameter
OBJ	Standard		Infinity	Infinity		0.000
*	Standard		Infinity	1.000	N15	2.500
2*	Lens Array	LENS ARRAY	-9.300	18.600	M	2.500
3	Standard		Infinity	90.000		1.487
4*	Standard		90.000	4.000	N15	6.000
5*	Standard		-90.000	45.000		6.000
6*	Standard		40.000	3.000	N15	6.000
7*	Standard		-40.000	39.361	M	6.000
IMA	Standard		Infinity	-		0.589

图 4 Hd-MMM 系统透镜组合的参数

Fig.4 Parameters of the lens combination in Hd-MMM system

图 4 给出了图 2 中透镜组合的具体参数。Hd-MMM 系统所采用的分光元件是 7×7 的微透镜阵列,每个微透镜的直径为 $0.5\ \text{mm}$,焦距为 $18.6\ \text{mm}$ 。透镜 L1 的焦距为 $90\ \text{mm}$,L2 的焦距为 $40\ \text{mm}$ 。可以看到在 L2 的后焦面也就是管镜 TL 的前焦平面上形成的焦点阵列的半高为 $0.589\ \text{mm}$ 。那么焦点阵列的相邻焦点间距为

$$\frac{2r}{m} = \frac{2 \times 0.589\ \text{mm}}{6} = 0.196\ \text{mm}, \quad (1)$$

式中 r 为焦点阵列半高, m 为焦点阵列的相邻焦点间距数。

Hd-MMM 系统中使用的物镜是 $60\times$ 的油浸物镜,那么由以上模拟出的焦点阵列经过管镜 TL 和物镜后聚焦在样品上的相邻焦点间距应为

$$\frac{0.196\ \text{mm}}{60} = 3.2\ \mu\text{m}, \quad (2)$$

即在样品上进行激发的焦点阵列的相邻焦点间距为 $3.2\ \mu\text{m}$,使用这样的焦点阵列对样品激发可以在保持高分辨率的情况下减少扫描次数,提高成像速度。图 1 中的 Hd-MMM 系统即根据此模拟结果选取光学元件。

3.2 高密度激发点阵成像产生噪声的原因

现有的 MMM 系统的扫描焦点阵列的相邻焦点间距要大于等于 $6\ \mu\text{m}$, 这是由于当焦点焦距小于 $6\ \mu\text{m}$ 时, 焦点阵列相邻子光束的尾部会发生干涉, 从而激发离焦面样品产生干扰荧光影响成像质量。其原理如图 5 所示。图 5(a) 所示是相邻焦点间距较大 (大于等于 $6\ \mu\text{m}$) 时, 激发光在样品内部有唯一的焦平面, 可以获得高空间分辨率的荧光成像。当焦点间距减小 ($3\ \mu\text{m}$) 时 [图 5(b)], 在焦面上下 (纵向) 各激发子光束重叠的区域, 有可能达到足够高的激发光子密度而产生双光子激发荧光, 这样, 探测系统如 ICCD 相机所接收的就有来自非焦面的荧光信号, 这种信号的串扰在相邻各焦点之间尤其严重, 从而使系统丧失纵向空间分辨的能力。

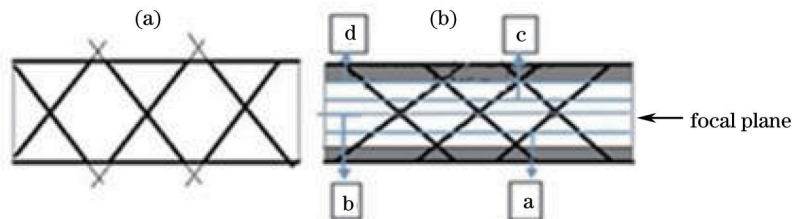


图 5 子光束尾部(a)未产生干涉和(b)产生干涉的示意图

Fig.5 Diagrammatic sketches of beamlets' end (a) without interference and (b) with interference

图 6 与图 5(b) 相对应, 是用 Zemax 模拟的不同成像面上的焦点阵列的子光束的光线分布图。图 6(a) 为子光束还未到达焦平面时的光线分布图, 图 6(b) 为子光束在焦平面产生焦点阵列的光线分布图, 图 6(c) 为子光束离开焦平面时的光线分布图, 图 6(d) 为子光束开始产生干涉的光线分布图, 此干涉即为焦平面下方激发子光束重叠区域产生双光子激发所致。

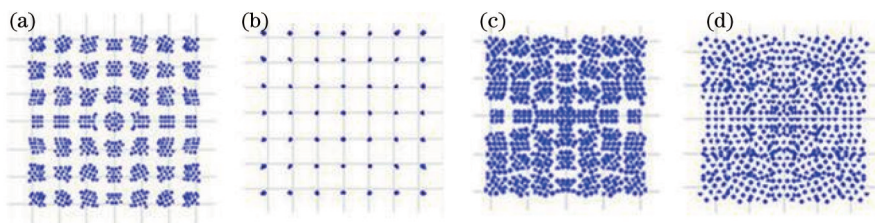


图 6 焦点阵列子光束在不同成像面上的光线分布图。(a)子光束还未到达焦平面时;(b)子光束在焦平面产生焦点阵列;(c)子光束离开焦平面时;(d)子光束开始产生干涉

Fig.6 Ray distribution profiles of multifocal array on different imaging planes. (a) Beamlets don't reach the focal plane; (b) foci array is generated on the focal plane; (c) beamlets leave focal plane; (d) interference between beamlets

可见子光束尾部相交时, 能量会叠加变大。对于双光子激发荧光显微系统, 能量超过双光子激发阈值时, 就会在离焦面激发样品产生干扰荧光, 这样就影响了纵向空间分辨率, 降低了显微系统的切片能力。而且, 在模拟过程中可以发现焦点间距越小, 离焦面的荧光激发面距焦平面越近, 光束尾部干涉的相干性就越强, 产生的干扰荧光越强, 成像的噪声就越大。所以消除子光束尾部干涉引起的噪声是高密度点阵激发显微系统亟需解决的问题。

3.3 时间延板设计

解决相邻子光束间串扰问题的关键是破坏各子光束在重叠区域产生激发的条件。时分复用技术^[8-10]是利用一个不同厚度的玻璃阵列对相邻子脉冲进行不同时间延迟的技术。

图 7 为时间复用技术的原理图。如图 7 所示, 激光脉冲经过微透镜阵列变为子脉冲阵列, 时间延板的不同厚度的玻璃将对子脉冲产生不同的时间延迟。利用这一原理可以对 Hd-MMM 系统中的子光束脉冲进行时间延迟, 使得相邻子光束脉冲在不同的时间聚焦在样品的焦平面激发产生荧光。如果延迟的时间足够长, 那么相邻子光束的尾部因时间差不会相遇发生干涉从而激发样品的离焦面。

现有 MMM 系统中使用的光源是钛蓝宝石飞秒激光器, 激发光波长为 $780\ \text{nm}$, 脉冲宽度约为 $100\ \text{fs}$ 。为了使相邻子光束的尾部不发生重叠, 就需要使时间延板对相邻子光束脉冲的延迟时间至少为一个脉冲宽度。由此可以计算出时间延板每类玻璃的厚度差 Δd 。

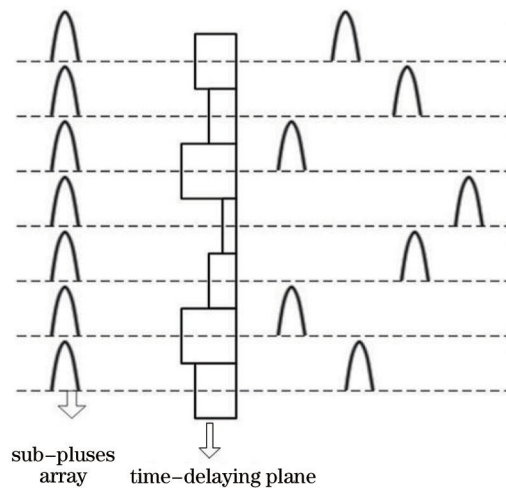


图7 时间复用技术的原理图

Fig.7 Schematic diagram of time multiplexing technology

时间延板的材料为玻璃,其折射率为 $n = 1.5$ 。真空中光速 $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$,根据公式

$$n = \frac{c}{v}, \tag{3}$$

式中 v 为介质中的光速,可以算出玻璃中的光速:

$$v_g = \frac{c}{n} = \frac{3 \times 10^8 \text{ m/s}}{1.5} = 2 \times 10^8 \text{ m/s}. \tag{4}$$

再根据公式:

$$\frac{\Delta d}{v_g} - \frac{\Delta d}{c} = t, \tag{5}$$

式中 Δd 为玻璃子类的厚度差, $t = 100 \text{ fs}$ 为相邻子光束的最小时间延迟。

可以算出:

$$\Delta d = 60 \mu\text{m},$$

所以时间延板子类的厚度为

$$d_i = i \times 60 \mu\text{m}, \quad i = 1, 2, 3, \dots \tag{6}$$

相应于 Hd-MMM 中 7×7 的微透镜阵列设计 7×7 的时间延板,为了使相邻子类的玻璃厚度都不同,需要四个子类,根据以上公式,每个子类的厚度为 $d_i = i \times 60 \mu\text{m} (i = 1, 2, 3, \dots)$ 。图 8 给出了时间延板上四个子类的排列分布图,用四个不同的图案分别代表四个子类,相同玻璃厚度的子类互不相邻。利用 Zemax 软件,

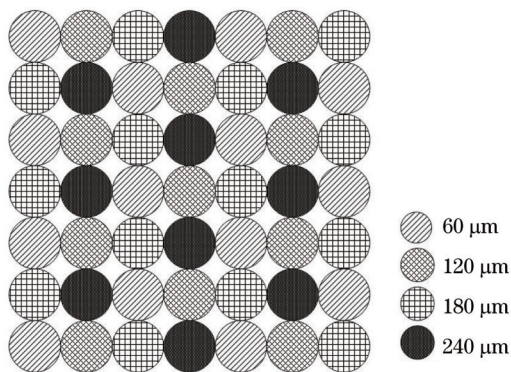


图8 延板四个子类的分布

Fig.8 Distribution of four subclasses on time-delaying plate

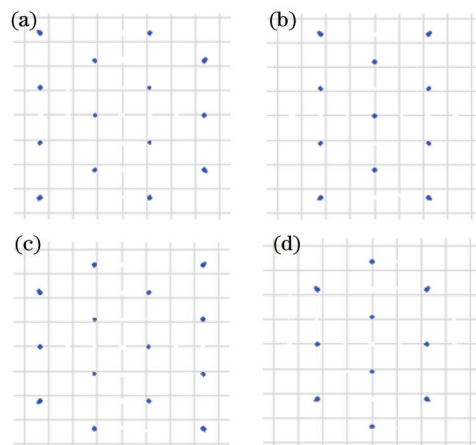


图9 四个子类在焦平面上的焦点分布图

Fig.9 Focus distribution profiles of four subclasses on the focal plane

又分别模拟了四个子类阵列在焦平面上的焦斑分布图,如图9所示。由几何关系可以得到相同子类的相邻焦点间间距均大于 $6\ \mu\text{m}$,这样通过相同子类的子光束聚焦在样品上所产生的荧光信号不会产生串扰,具有好的纵向分辨率。

时间延板对四个子类延迟的时间不同,因此相邻子脉冲到达样品上的时间不同,这样即使各子光束尾部在焦面上上下重叠,也不会产生双光子激发荧光。另外,这个延迟是发生在各个焦点之间的,不会影响同一个焦点的荧光发射。将四个子类在不同时间激发样品得到的荧光信号叠加收集,就可以得到高密度点阵激发样品的荧光图像,解决了MMM系统中相邻焦点子光束发生串扰影响成像分辨率的问题。此外,由于时间延板的厚度不大于 $240\ \mu\text{m}$,对于超快脉冲的脉宽和聚焦光斑的影响不是很大,所以暂不考虑^[13]。将这个时间延板加在图1中Hd-MMM系统的微透镜阵列后,即可实现高密度激发点阵相邻子光束间无串扰激发荧光的高分辨率快速显微成像。

4 结 论

利用Zemax模拟优化了高密度MMM成像系统的透镜参数,设计相邻焦点间距为 $3.2\ \mu\text{m}$;根据时分复用技术设计了可以消除高密度点阵激发成像系统成像噪声的时间延板,不同厚度,且厚度差为 $60\ \mu\text{m}$ 的玻璃阵列可以对相邻子脉冲进行不同的时间延迟,避免相邻子光束尾部在样品内重叠激发荧光。将所有的焦点分为具有不同延迟的组,同一组内的焦点互不相邻,而相邻点之间由于时间的延迟,消除了信号的串扰,从而保证了Hd-MMM具有和单点扫描多光子激发荧光显微相近的纵向空间分辨率。结合高密度激发点阵的MMM系统和时间延板,在理论上可以实现高速、高分辨率的成像。

高速高分辨率荧光显微成像的实现,可以在不破坏样品和保持高分辨率的情况下提高成像速度,对于生物物理学和细胞生物学的研究具有重要意义^[14]。

参 考 文 献

- 1 T Wilson, C Sheppard. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy [M]. London: Academic Press, 1984.
- 2 W Denk, J H Strickler, W W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73-75.
- 3 A H Buist, M Muller, J Squier, *et al.*. Real time two-photon absorption microscopy using multipoint excitation [J]. J Microsc, 1998, 192(2): 217-226.
- 4 J Bewersdorf, R Pick, S W Hell. Multifocal multiphoton microscopy [J]. Opt Lett, 1998, 23 (9): 655-657.
- 5 T Nielsen, M Fricke, D Hellweg, *et al.*. High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy [J]. J Microsc, 2001, 201(3): 368-376.
- 6 L Sacconi, E Froner, R Antolini, *et al.*. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element [J]. Opt Lett, 2003, 28(20): 1918-1920.
- 7 Liu Lixin. Multifocal multiphoton microscopy and its research progress [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(6): 711-717. 刘立新. 多焦点多光子显微技术及其研究进展[J]. 激光生物学报, 2011, 20(6): 711-717.
- 8 A Egner, S W Hell. Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy [J]. J Opt Soc Am A, 2000, 17(7): 1192-1201.
- 9 V Andresen, A Egner, S W Hell. Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope [J]. Opt Lett, 2001, 26(2): 75-77.
- 10 D Oron, E Tal, Y Silberberg. Scanningless depth-resolved microscopy [J]. Opt Express, 2005, 13(5): 1468-1476.
- 11 Y Shao, J Qu, H Li, *et al.*. High-speed spectrally resolved multifocal multiphoton microscopy [J]. Appl Phys B, 2010, 99 (4): 633-637.
- 12 J E Jureller, H Y Kim, N F Scherer. Stochastic scanning multiphoton multifocal microscopy [J]. Opt Express, 2006, 14 (8): 3406-3414.
- 13 Liu Qiangsheng, Cen Zhaofeng, Li Xiaotong, *et al.*. Spatial-temporal-property analysis of ultrashort pulse propagating through real optical system [J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(1): 0132001. 刘强生, 岑兆丰, 李晓彤, 等. 超短脉冲通过实际光学系统的时空特性分析[J]. 光学学报, 2013, 33(1): 0132001.
- 14 Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(11): 1369-1377.