

折射率不匹配引入的像差对共聚焦显微成像的影响

肖 昀^{1,2,3} 张运海¹ 檀慧明¹

¹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

²中国科学院大学, 北京 100049

³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 为了研究折射率不匹配引入的像差对共聚焦显微镜成像的影响, 根据 Richards 和 Wolf 矢量衍射积分建立计算模型, 分析共聚焦显微镜常用的两种情况中存在折射率不匹配时的点扩散函数(PSF), 并通过实验进行验证。光束经过折射率不匹配的油-盖玻片-水聚焦时, 探测深度从 0.5 μm 增至 10 μm , 其 PSF 的 z 轴半峰全宽(FWHM)从 0.4391 μm 变为 0.931 μm , 其光强最大值从 1.161 降为 0.4119。当探测深度为 10 μm 时, 折射率匹配的空气-空气-空气的 PSF 的 z 轴 FWHM 为 1.059 μm , 光强最大值为 1; 而折射率不匹配的空气-玻璃-水的 PSF 的 z 轴 FWHM 为 7.5 μm , 光强最大值为 0.04632。当探测深度较大时, 折射率不匹配引入的像差会导致光斑变大和不对称, 能量分散, 影响成像质量。

关键词 共聚焦; 折射率不匹配; 点扩散函数; 矢量衍射积分

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP52.021801

Effect of Aberration Induced by Refractive Index Mismatch on Imaging in Confocal Microscopy

Xiao Yun^{1,2,3} Zhang Yunhai¹ Tan Huiming¹

¹Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Science, Suzhou, Jiangsu 215613, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

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

Abstract According to Wolf and Richard's vectorial diffraction integral, a model is established, and the point spread function (PSF) in the two common conditions of confocal microscopy with a refractive index mismatch to study the effect of aberration induced by refractive index mismatch on imaging in confocal microscopy. The model is tested by experiment. When the beams focus into a spot through oil, coverslip and water, the full width at half maximum (FWHM) of the PSF along the z axis is broadened from 0.4391 μm to 0.931 μm with the detective depth from 0.5 μm to 10 μm . And the maximum intensity of the PSF is reduced from 1.161 to 0.4119. When the detective depth is 10 μm , the FWHM of the PSF with the refractive index match along the z axis is 1.059 μm , and its maximum intensity is 1. But the FWHM of the PSF with refractive index mismatch along the z axis is 7.5 μm , and its maximum intensity is 0.04632. When the detective depth is large, the aberration induced by refractive index mismatch can make light spot bigger, dispersive energy and influent the imaging quality.

Key words confocal; refractive index mismatch; point spread function; vectorial diffraction integral

OCIS codes 180.1790; 350.5730; 120.4820; 120.1880

收稿日期: 2014-08-10; 收到修改稿日期: 2014-08-19; 网络出版日期: 2015-01-15

基金项目: 国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1)、苏州医工所二期重大项目(Y052031205)和苏州应用基础研究计划项目(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, 研究员, 博士生导师, 主要从事超分辨显微光学成像技术方面的研究。

E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn(通信联系人)

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和必备的大型科学仪器,在生物和工业检测领域得到了广泛应用。该系统采用精密针孔滤波技术,使得只有处于焦平面位置上的信息能够被探测,最大限度地抑制了非聚焦平面的杂散光,具有很高的成像分辨率和信噪比^[1];同时系统沿 z 轴方向可以实现无损光学断层扫描,从而实现对较厚样本的三维成像^[2]。用于生物学研究的SCM,在组织生物学、细胞生物学、分子生物学、基因学、胚胎学、神经学、病理学、免疫学、流行病学、肿瘤学、细菌学、病毒学等领域具有广泛的应用^[3]。

共聚焦显微技术的概念最早由Minsky在20世纪50年代提出,第一台商业化的共聚焦显微镜直到1987年才问世。此后共聚焦显微技术引起了人们的高度重视,在理论和实践上不断出现新的进展,在理论上,更加全面地研究了系统的各种特性,提出了许多改进成像质量、提高成像分辨率的方案^[4-5];在实践方面,具备各种新功能的共聚焦显微镜不断进入市场。

共聚焦显微镜能提供很高成像质量的生物组织图片,但在实际使用时很多因素会降低最终的成像质量,常见的因素有激光功率大小的设置、探测器如光电倍增管阈值和增益的设置、荧光发射波长范围的选择、折射率不匹配引入的像差等,这其中折射率不匹配引入的像差直接使得系统成像的点扩散函数(PSF)变差,使得系统成像的分辨率和信噪比同时受到影响,在实际使用中经常存在而又不被使用者觉察。早在1993年,Hell等^[6]根据Fresnel-Kirchhoff积分讨论了入射光聚焦中折射率不匹配的问题,并分析了折射率不匹配引入的像差对共聚焦显微镜焦点位置、 z 轴峰值和PSF的半峰全宽(FWHM)等的影响。但是此积分公式由格林定量推导,这要求电场和其展开式的前两项在积分区域内和边界处具有连续性。而这和电场垂直分量、磁场的切向分量不符,因此最后的积分公式不够严谨。1994年,Hell等^[7]以相同的理论为基础,分析了双光子共聚焦显微镜中折射率不匹配的问题。2001年,Booth等^[8]根据Gibson等^[9]的像差公式研究了单光子和双光子显微镜中折射率不匹配引入的像差和像差校正的应用。2002年,Alberto等^[10]通过实验分析了折射率不匹配对高分辨共聚焦显微镜的影响。而Török等^[11]根据Richards和Wolf矢量衍射积分给出了电场经过介质界面聚焦的积分表达式。为了精确分析折射率不匹配对共聚焦显微镜的分析,本文在Török等的基础上结合理论和实验研究了折射率不匹配对系统成像质量的影响。

2 多种介质下物镜焦点处光波场模型

共聚焦显微镜在使用时,常见的情况是对生物组织切片进行观察,如图1所示,组织切片置于盖玻片和载玻片之间的组织溶液中,盖玻片和物镜之间充盈着填充介质,对于干性物镜该填充介质为空气,对于浸油物镜为浸油。从物镜出来的汇聚球面波前将经过填充介质、盖玻片、组织溶液,最终在组织溶液中汇聚成一个照明光点,假定填充介质、盖玻片、组织溶液的折射率分别为 n_1 、 n_2 、 n_3 ,忽略组织溶液和组织之间折射率的差异,盖玻片 n_2 的折射率约为1.515,组织培养液的折射率 n_3 约为1.33。如果填充介质为浸油,则折射率 n_1 为1.518;如果填充介质为空气,则折射率 n_1 为1.00。从物镜出射的汇聚球面波经过这三种介质时,由于介质的折射率不相同,从而产生像差,导致实际会聚焦点偏离高斯焦点,使得照明PSF能量分散,降低系统最终的成像分辨率和信噪比。图1中 p_0 为高斯焦点, p_1 为实际焦点,高斯焦点到盖玻片的距离为探测深度,记为 d_0 ,实际焦点 p_1 到高斯焦点 p_0 之间的距离记为 d_1 。

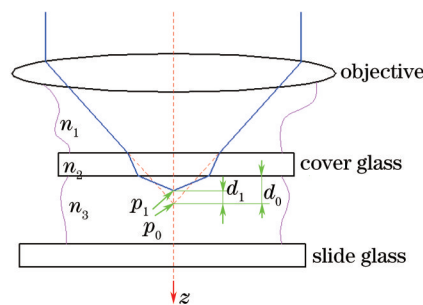


图1 对组织切片进行观察时的光传播情况

Fig.1 Light propagation observing the tissue section

在共聚焦显微镜中,入射照明光在物镜焦点处形成一个点状照明区域,它定义了被观察组织的照明位置和光强度分布,同时在成像探测方设置有一个针孔只允许被观察组织中一定区域内的光能够进入探测器。从物理上来讲,共聚焦显微镜的有效点扩散函数 P_{cf} 是照明 PSF 和探测 PSF 的乘积形成的^[12]

$$P_{cf} = |\mathbf{e}_{in}|^2 \times |\mathbf{e}_{det}|^2 \approx |\mathbf{e}_{in}|^4. \quad (1)$$

式中 \mathbf{e}_{in} 代表激发照明光的电矢量, \mathbf{e}_{det} 代表发射荧光的电矢量,它和 \mathbf{e}_{in} 比较相似,计算时采用荧光的波长, $|\mathbf{e}_{in}|^2$ 代表激发照明光的强度分布,即照明 PSF,如果激发光和荧光波长之间的差异比较小,则 $|\mathbf{e}_{in}|^2 \approx |\mathbf{e}_{in}|^2$,在这种情况下,有效 PSF 就和激发光电场强度的四次方成正比,也即和激发光强度的二次方成正比。

从该式可以看出,照明光电场强度分布或 PSF 分布基本决定了最终的有效 PSF 分布,即决定了系统的成像分辨率和信噪比。多层介质折射率不匹配引起的共聚焦显微镜成像质量下降可以通过研究照明 PSF 的分布进行定量分析。

以高斯焦点 p_0 为坐标原点,光轴为 z 轴,建立起直角坐标系,如图 2 所示,图中 S 为聚焦光线,介质 n_1 与 n_2 之间的界面位置为 $-h_1$,介质 n_2 与 n_3 之间的界面位置为 $-h_2$ 。把最后一层界面到原点的距离叫做探测深度 d 。点 p 为待求光强的点,其坐标为 (x_p, y_p, z_p) ,其球坐标为 (r, θ, ϕ) ,其中, $r > 0$, $0 \leq \theta < \pi$, $0 \leq \phi < 2\pi$, θ 表示顶角, ϕ 表示方位角,则点 p 在球坐标系中的坐标为 (r_p, ϕ_p, z_p) , \hat{r}_p 为点 p 的位置向量,可表示为

$$\hat{r}_p = r_p (\sin \theta_p \cos \phi_p \hat{i} + \sin \theta_p \sin \phi_p \hat{j} + \cos \theta_p \hat{k}), \quad (2)$$

式中 \hat{i} , \hat{j} , \hat{k} 为坐标系 (x, y, z) 的基向量。

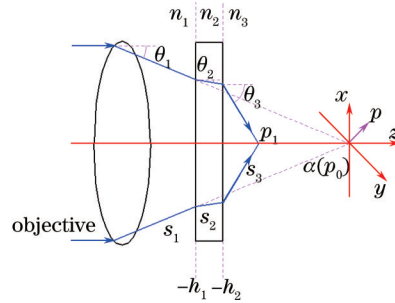


图2 平行光经过物镜在三种介质中聚焦

Fig.2 Focusing light by objective through three mediums

用 \mathbf{e} 表示待求点 p 的电场向量, $\boldsymbol{\varepsilon}$ 表示物镜出瞳处的电场强度向量,加粗的大写字母表示 3×3 张量矩阵,把最后一层界面到原点的距离叫做探测深度 d 。那么穿过三种介质的会聚光焦点附近点 p 处的电场 \mathbf{e}_{in} 为^[13-15]:

$$\mathbf{e}_{in}(r_p, \phi_p, z_p) = -\frac{ik_1}{2\pi} \int_0^{\alpha} \int_0^{2\pi} \boldsymbol{\varepsilon}_3 \exp(ik_0 \Psi) \exp[ik_1 r_p \sin \theta_1 \cos(\phi - \phi_p) \sin \theta_p] \exp(ik_3 z_p \cos \theta_3) \sin \theta_1 d\phi d\theta_1, \quad (3)$$

式中 $k_i = \frac{2\pi}{\lambda_{in}/n_i}$ 为介质 i 中的波数, k_0 为真空中的波数, n_i 为介质 i 的折射率, λ_{in} 为入射光在真空中的波长, α 是物镜的半孔径角,由 NA 和折射率 n_1 决定, θ_i 是介质 i 中的顶角, ϕ 是方位角。 Ψ 为折射率不匹配引入的像差函数,其表达式为

$$\Psi = h_2 n_3 \cos \theta_3 - h_1 n_1 \cos \theta_1. \quad (4)$$

$\boldsymbol{\varepsilon}_i$ 为光在介质 i 中靠近界面处的电场强度向量,在介质 n_1 中物镜出瞳位置处的电场强度向量 $\boldsymbol{\varepsilon}_1$ 为^[11]

$$\boldsymbol{\varepsilon}_1 = A_{in} P_{(1)} L_{(1)} R B \boldsymbol{\varepsilon}_0. \quad (5)$$

在第三层介质中,电场强度向量 $\boldsymbol{\varepsilon}_3$ 为

$$\boldsymbol{\varepsilon}_3 = R^{-1} P_{(3)}^{-1} I_2 \boldsymbol{\varepsilon}_1, \quad (6)$$

式中 $P_{(i)}$ 为光在传播中的坐标转换矩阵, I_2 表示界面对电场的影响,其矩阵表达式^[4,16]分别为:

$$P_{(i)} = \begin{pmatrix} \cos \theta_i & 0 & -\sin \theta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta_i & 0 & \cos \theta_i \end{pmatrix}, I_2 = \begin{pmatrix} T_p^{(2)} & 0 & 0 \\ 0 & T_s^{(2)} & 0 \\ 0 & 0 & T_p^{(2)} \end{pmatrix}$$

$$R = \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, L_{(i)} = \begin{pmatrix} \cos \theta_i & 0 & \sin \theta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta_i & 0 & \cos \theta_i \end{pmatrix}. \quad (7)$$

$T_{s,p}^{(2)}$ 为经过二层界面时垂直偏振光和平行偏振光的透射系数,其表达式为

$$T_m^{(2)} = \frac{t_m^{(2)} t_m^{(1)} \exp(i\beta_2)}{D_m^{(2)}}, \quad (8)$$

式中 $\beta_2 = k_2(h_1 - h_2)\cos \theta_2$, $m = p, s$, $D_m^{(2)} = 1 + r_m^{(1)} r_m^{(2)} \exp(2i\beta_2)$, $t_p^{(i)}$, $t_s^{(i)}$, $r_p^{(i)}$, $r_s^{(i)}$ 分别是菲涅尔透射系数和菲涅尔反射系数,其表达式为^[9]:

$$t_p^{(i)} = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_{i+1} \cos \theta_i + n_i \cos \theta_{i+1}}, t_s^{(i)} = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_{i+1} \cos \theta_{i+1}},$$

$$r_p^{(i)} = \frac{n_{i+1} \cos \theta_i - n_i \cos \theta_{i+1}}{n_{i+1} \cos \theta_i + n_i \cos \theta_{i+1}}, r_s^{(i)} = \frac{n_i \cos \theta_i - n_{i+1} \cos \theta_{i+1}}{n_i \cos \theta_i + n_{i+1} \cos \theta_{i+1}}. \quad (9)$$

把(5),(7),(8),(9)式代入(6)式中可以得出 ε_3 ,将 ε_3 代入(3)式中可以计算出点 p 的电场强度,电场强度取平方后可以得到 p 点的光强,通过在高斯焦点附近计算大量点的光强值可以得出照明 PSF 分布。

3 折射率不匹配时焦点光波场模型计算仿真

共聚焦显微镜主要有两大类型:1) 主要用在材料检测^[17-18],常用材料的反射或散射光直接成像,在这种情况下,被观察的物质和物镜之间往往只有一种介质,多层介质之间折射率不匹配对其影响相对较小;2) 主要用于生物学研究中^[19-20],被观测的生物组织往往被固定在盖玻片和载玻片之间,常用生物组织中的荧光染料激发出的荧光进行成像,在这种情况下,物镜和被观测组织之间往往有三层介质,这三种介质之间折射率如果不一致就会产生像差。

在采用共聚焦显微镜对生物组织进行观察时,有两种经常遇到的情况由于介质之间折射率差异较大将对成像质量造成影响。一种情况是生物组织封装在盖玻片和载玻片之间的水样溶液中,溶液的折射率约为 1.33,采用浸油物镜进行观察,浸油和盖玻片的折射率接近相等,约为 1.515,此种情况下溶液和盖玻片之间的折射率有较大的差异,显微成像时成像质量将会受到影响;另一种情况是采用非浸液油物镜对上述生物组织进行观察,此时物镜和盖玻片之间是空气,折射率约为 1.00,这样一来空气的折射率、盖玻片的折射率和溶液的折射率三者之间都相差较大,显微成像时成像质量也将会受到影响,下面根据上节的理论公式对这两种情况进行计算仿真,由于照明 PSF 直接决定和反映了系统的成像质量,下面计算仿真两种折射率不匹配情况下的照明 PSF。

3.1 油-玻璃-溶液计算仿真

由于浸油和盖玻片采用的玻璃折射率接近相对,约为 1.515,为简便起见,忽略二者之间的差异,这种情况下三种介质的折射率分别取为 1.515,1.515,1.33。为了分析此种情况下折射率不匹配对成像质量的影响,将这种情况和折射率匹配介质情况进行比较,在折射率匹配介质情况下,三种介质的折射率均取为 1.515。计算仿真时选取物镜的数值孔径为 1.3。

折射率匹配情况下的三种介质折射率相同,没有像差引入。当探测深度为 0.5 μm 时,照明 PSF 比较对称,其 x 轴的 FWHM 为 0.24 μm , z 轴的 FWHM 为 0.5882 μm ;当探测深度为 10 μm 时,照明 PSF 依旧对称,其 x 轴的 FWHM 为 0.24 μm ,其 z 轴的 FWHM 为 0.588 μm 。因此,当没有像差引入时,随着探测深度的增加,照明 PSF 基本不变,如图 3(a)和(b)所示。

由于水溶液和盖玻片玻璃及浸油之间折射率差异较大,折射率不匹配,会有像差引入。当探测深度为 0.5 μm 时,照明 PSF 沿 z 轴不对称,其 x 轴的 FWHM 为 0.28 μm ,其 z 轴的 FWHM 为 0.4391 μm ;当探测深度为 10 μm 时,照明 PSF 依旧对称,其 x 轴的 FWHM 为 0.28 μm ,其 z 轴的 FWHM 为 0.931 μm 。因此,当有像差引入

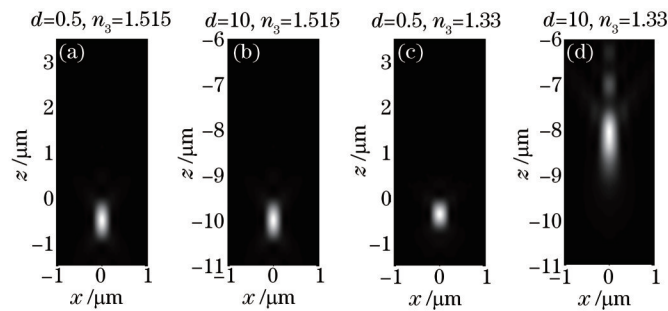


图3 照明 PSF。(a) 为三种介质折射率为 1.515、探测深度为 0.5 μm 的 PSF；(b) 三种介质折射率为 1.515、探测深度为 10 μm 的 PSF；(c) 三种介质折射率分别为 1.515、1.515、1.33，探测深度为 0.5 μm 的 PSF；(d) 三种介质折射率分别为 1.515、1.515、1.33，探测深度为 10 μm 的 PSF

Fig.3 Illumination point spread function. (a) PSF for refractive index match with $d=0.5 \mu\text{m}$; (b) PSF for refractive index match with $d=10 \mu\text{m}$; (c) PSF for refractive index mismatch with $d=0.5 \mu\text{m}$; (d) PSF for refractive index mismatch with $d=10 \mu\text{m}$ 时,随着探测深度的增加,照明 PSF 的 x 轴宽度基本不变, z 轴长度增加并且不对称,如图 3(c)和(d)所示。

折射率不匹配的照明 PSF 的 x 轴宽度比折射率匹配的照明 PSF 的 x 轴宽度大,并且不随探测深度变化。当探测深度较小时,折射率不匹配的照明 PSF 的 z 轴长度小于折射率匹配的照明 PSF 的 z 轴长度,而当探测深度较大时,折射率不匹配的照明 PSF 的 z 轴长度远大于折射率匹配的照明 PSF 的 z 轴长度。

当探测深度为 0.5 μm 时,折射率匹配的照明 PSF 的光强分布归一化,其最大值为 1,而折射率不匹配的照明 PSF 的最大值为 1.161,由于其光斑较小,能量比较集中,其最大值大于折射率匹配的光斑最大值,如图 4(a)和(b)所示。当探测深度从 0.5 μm 增至 10 μm 时,折射率匹配的照明 PSF 基本不变,其光强最大值为 1,而折射率不匹配的照明 PSF 的光强最大值为 0.4119,由于其光斑变大,能量分散,最大值变小,如图 4(c)和(d)所示。

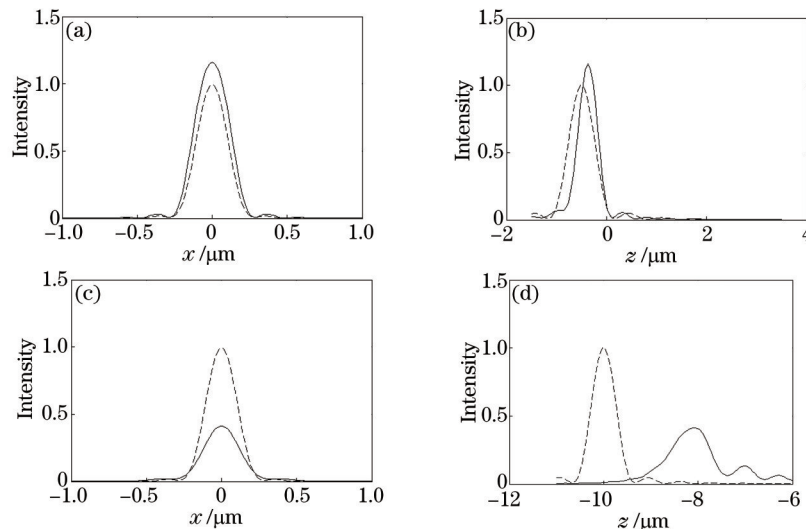


图4 归一化光强分布曲线图。(a) 探测深度为 0.5 μm 的 x 轴强度分布,虚线对应三种介质折射率为 1.515,实线对应三种介质折射率分别为 1.515、1.515、1.33; (b) 探测深度为 0.5 μm 的 z 轴强度分布; (c) 为探测深度为 10 μm 的 x 轴强度分布; (d) 为探测深度为 10 μm 的 z 轴强度分布

Fig.4 Normalized intensity graph: The dashed represent refractive index match, and the solid line represents refractive index mismatch. (a) Intensity distribution along x axis with $d=0.5 \mu\text{m}$; (b) intensity distribution along z axis with $d=0.5 \mu\text{m}$; (c) intensity distribution along x axis with $d=10 \mu\text{m}$; (d) intensity distribution along z axis with $d=10 \mu\text{m}$

因此,当探测深度较大时,折射率不匹配的照明 PSF 的 z 轴长度增加且不对称,并导致能量分散。照明 PSF 变大且不对称会导致成像分辨率下降,降低成像质量;能量分散会减少样品的荧光信号,减小信噪比和对比度,降低成像质量。

3.2 空气-玻璃-溶液计算仿真

由于空气的折射率为 1,选取常用的数值孔径为 0.8 的物镜,分别对折射率匹配和空气-玻璃-水两种条

件下的照明 PSF 进行计算分析。折射率匹配情况下的折射率相同,都为 1;空气-玻璃-水组合的折射率分别为 1、1.515 和 1.33,此种情况下,折射率差异较大。

由于折射率匹配情况下折射率相同,没有像差引入,照明 PSF 比较均匀,其 x 轴 FWHM 为 $0.36 \mu\text{m}$, z 轴 FWHM 为 $1.059 \mu\text{m}$;空气-玻璃-水介质组合折射率不匹配,有像差引入,照明 PSF 比较大且不对称,其 x 轴 FWHM 为 $0.6 \mu\text{m}$, z 轴 FWHM 为 $7.5 \mu\text{m}$ 。折射率不匹配的空气-玻璃-水的照明 PSF 的 x 轴和 z 轴长度都大于折射率匹配情况的照明 PSF,并且照明 PSF 明显不对称,一侧存在较大的次极大值,如图 5(a)、(b)所示。

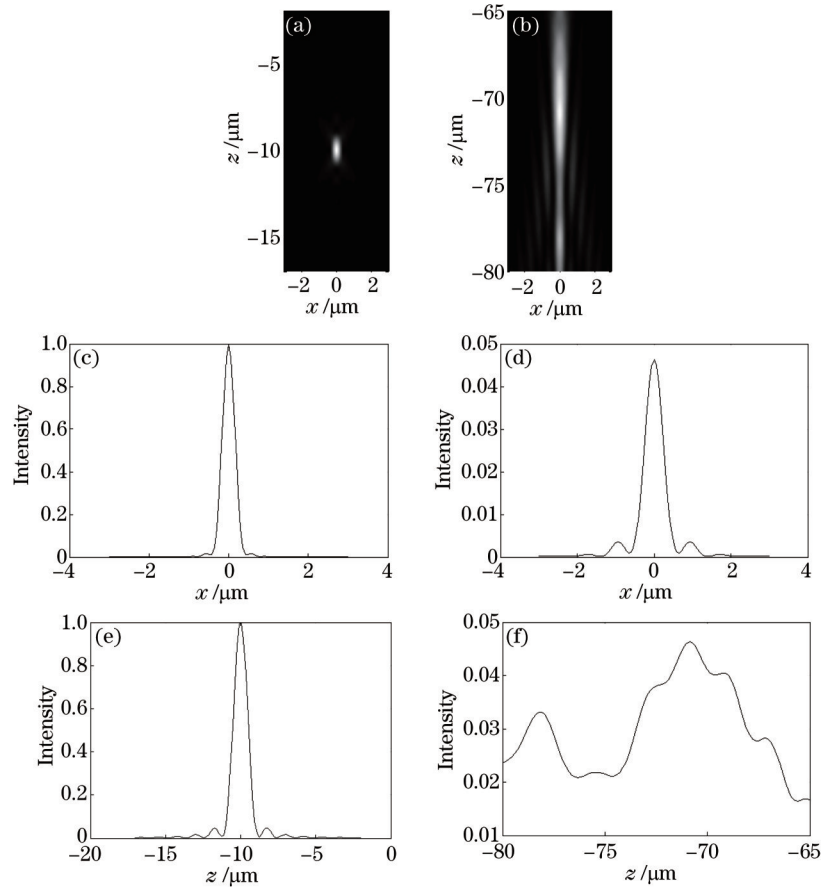


图5 探测深度为 $10 \mu\text{m}$ 的 PSF。(a) 折射率匹配情况的 PSF,折射率均为 1;(b) 空气-玻璃-水介质组合的 PSF,其折射率分别为 1、1.515、1.33;(c) 折射率匹配介质的 PSF 的 x 轴强度分布;(d) 空气-玻璃-水介质组合的 PSF 的 x 轴强度分布;(e) 折射率匹配介质的 PSF 的 z 轴强度分布;(f) 空气-玻璃-水介质组合的 PSF 的 z 轴强度分布

Fig.5 PSF with $d=10 \mu\text{m}$. (a) PSF for refraction index match; (b) PSF for refraction index mismatch; (c) intensity distribution of the PSF along x axis for refraction index match; (d) intensity distribution of the PSF along x axis for refraction index mismatch; (e) intensity distribution of the PSF along z axis for refraction index match; (f) intensity distribution of the PSF along z axis for refraction index mismatch

对折射率匹配的照明 PSF 的强度分布归一化,强度最大值为 1,而空气-玻璃-水介质组合的照明 PSF 的强度最大值为 0.04632,强度次极大值为 0.03316。这是由于折射率不匹配引入的像差导致光斑变大和不对称,出现了一个接近最大值的次极大值,导致能量分散比较严重,如图 5(f)所示。

由于空气-玻璃-水中的三种介质折射率都不相同(折射率为 1、1.515、1.33),与上节中介质折射率分别为 1.515、1.515 和 1.33 的介质组合相比,折射率不匹配比较严重,从而导致光斑更大,不对称性更明显,能量更分散。这种照明 PSF 会急剧降低分辨率、信噪比和对比度,影响成像质量。因此,当入射介质为空气-玻璃-水时,应该尽量观察靠近玻璃(即盖玻片)的样品。

4 折射率不匹配对成像影响的实验结果

在共聚焦显微镜实验系统中,采用数值孔径为 1.4 的 100 倍物镜,通过三维纳米位移台分别移动封片剂

和水溶液中的 150 nm 金粒子对照明 PSF 进行 x - z 平面扫描成像。封片剂中金粒子成像实验中,光经过的介质分别为介质油、盖玻片和封片剂。它们的折射率分别为 1.518、1.515 和 1.52。由于三种介质的折射率接近,其成像结果应该与上文中三种介质折射率匹配情况(均取为 1.515)仿真的照明 PSF 相似。水溶液中金粒子成像实验中,光经过的介质分别为介质油、盖玻片和水。它们的折射率分别为 1.518、1.515 和 1.33。由于油和盖玻片的折射率与 1.515 接近,其成像结果应该与上文中三种介质分别为 1.515、1.515 和 1.33 仿真的照明 PSF 相似。

封片剂金粒子成像中,三种介质的折射率接近,引入的像差较小,而水溶液金粒子成像中,水与其余两种的折射率相差较大,引入的像差较大。因此,后者的 PSF 的 x 轴长度大于前者长度,如图 6 所示。这是由于折射率不匹配造成的,与上文的计算结果一致。由于金粒子所在的介质层(水或者封片剂)比较薄,所以两种情况下的 PSF 的 z 轴长度差别不是很大,和上文中探测深度为 0.5 μm 的情形相似。

从图 6(a)和(b)中可以看出两种 PSF 的上下两端不对称。这是由油、盖玻片和水(或者封片剂)之间的折射率不匹配造成的。虽然油、盖玻片和封片剂之间的折射率很小,但也会造成 PSF 的不对称。由于探测深度较小,两种 PSF 不对称性相差不大。除此之外,图 6(a)的背景比较暗,而图 6(b)中的中间区域背景比较亮。这也是由于盖玻片和水的折射率不匹配,增加了介质层之间的光反射,引入了杂散光,从而降低信噪比和对比度。

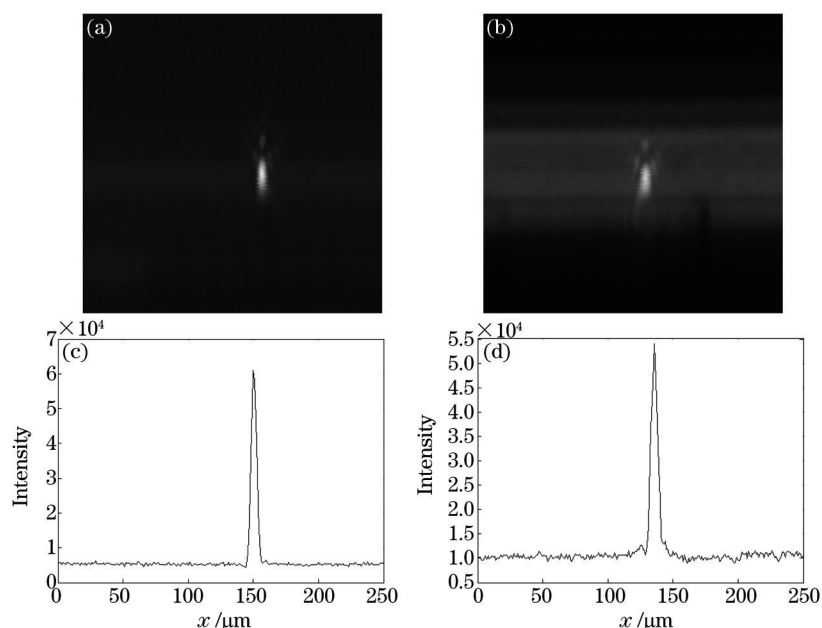


图6 实验结果。(a) 三种介质折射率分别为 1.518、1.515 和 1.52 的 x - z 平面 PSF; (b) 三种介质折射率分别为 1.518、1.515 和 1.33 的 x - z 平面 PSF; (c) 为(a)的 x 轴光强曲线图; (d) 为(b)的 x 轴光强曲线图

Fig.6 Experimental results. (a) PSF in x - z plane with refraction indexes 1.518,1.515 and 1.52; (b) PSF in x - z plane with refraction indexes 1.518,1.515 and 1.33; (c) intensity graph along x axis of (a), (d) intensity graph along x axis of (b)

因此,通过实验表明折射率不匹配会导致 PSF 变大,产生不对称性,降低信噪比和对比度。但和计算仿真中不同的是实验结果中为共聚焦 PSF,两次引入了折射率不匹配产生的像差,而计算仿真中为照明 PSF,只引入了一次像差。虽然,二者不一致,但都能证明折射率不匹配会影响成像质量,且相同的条件下对成像的影响是类似的。

5 讨 论

折射率不匹配引起的成像质量下降在实际共聚焦显微镜使用中经常遇到。例如,使用大数值孔径的浸油物镜对水溶液中的组织样本观测时就会出现成像质量下降的情况。折射率不匹配影响成像质量具体表现为:折射率不匹配时,PSF 变得弥散,且随着离开盖玻片的距离越远弥散情况越严重,这种弥散主要是由于球差引起的;当被观测组织离开玻片时,成像探测方探测到的荧光强度会显著下降,离开玻片的距离越远,荧光强度

下降越严重,图像信噪比就会降低;PSF在轴向出现了严重的拖尾现象,轴向分辨率会下降; xy 方向的分辨率同样也会下降一些,这是由于球差的影响使得位于较高数值孔径区域的光线不能在焦点处聚焦;随着实际聚焦面离开玻片的距离越远(探测深度越大),实际聚焦面离开高斯焦面的距离越大,PSF越弥散。

在对折射率显著不匹配的组织样本进行观测时,离开玻片不同距离处的PSF是不相同的,因此靠图像解卷积的方法恢复图像只能对一层的图像有效,不存在对各层图像同时有效的PSF用于恢复图像。

实际实验中减小折射率不匹配影响的方法为尽可能减小实验时的折射率匹配误差。主要措施有:使用合适的物镜,大数值孔径物镜如数值孔径为1.4的浸油物镜通常被设计用来观测靠近玻片的薄层组织,当穿过培养皿的底部观测培养皿中的组织样本时,需要选择带校正环的物镜,利用校正环将球差校正到最小;厚的组织样本只能用折射率匹配的系统进行观察,即组织所在的培养液和物镜所在的介质液折射率在各个波长下均应接近相等,例如浸水物镜只能用于对水溶液中的组织样本进行观测,浸甘油物镜只能用于对甘油溶液中的组织样本进行观察;避免出现所观察的生物组织远离盖玻片的情形,这种情况经常出现,例如物镜紧贴在盖玻片时,聚焦面就离盖玻片的距离较远。

如果只能对折射率不匹配的组织样本进行观察,也有一些措施可以减小对成像的影响,主要措施有:随着被观察的组织离开盖玻片的距离变远,探测通道中的针孔直径应将逐渐调大,这时虽然不能提高PSF,但可以提高成像的信噪比并且不会明显降低系统的分辨率;对靠近玻片表面的组织观察时,采用数值孔径较大的浸油物镜,对远离盖玻片的组织样本进行观察时,采用数值孔径较小的浸油物镜;如果实验系统中的物镜不提供校正球差的校正环,可以考虑在系统光路中增加球差校正的设备如变形镜或空间光调制器。

6 结 论

分析了油-玻璃-溶液和空气-玻璃-溶液两种常用情况下折射率不匹配对PSF的影响。通过分析发现,当探测深度较大时,折射率不匹配引入的像差会导致PSF变大、不对称,能量分散,降低成像质量。在实际应用中,应该尽量观察靠近盖玻片的样本,并根据样本的特性,选择合适的物镜观察,尽量减小折射率不匹配。

参 考 文 献

- 1 T Wilson. Confocal Microscopy[M]. London: Academic Press, 1990, 426: 1-64.
- 2 Y Zhang, B Hu, Y Dai, *et al.*. A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope[J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2013. 8.
- 3 P Davidovi, M D Egger. Scanning laser microscope for biological investigations[J]. Appl Opt, 1971, 10(7): 1615-1619.
- 4 M J Nasse, J C Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy[J]. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 2010, 27(2): 295-302.
- 5 Xiao Yun, Zhang Yunhai, Wang Zhen, *et al.*. Effect of incident laser on resolution of LSCM[J]. Optics and Precision Engineering, 2014, 22(1): 31-38.
肖 昉, 张运海, 王 真, 等. 入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响[J]. 光学精密工程, 2014, 22(1): 31-38.
- 6 S Hell, G Reiner, C Cremer, *et al.*. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index[J]. Journal of Microscopy, 1993, 169(3): 391-405.
- 7 H Jacobsen, P Hänninen, E Soini, *et al.*. Refractive-index-induced aberrations in two-photon confocal fluorescence microscopy[J]. Journal of Microscopy, 1994, 176(3): 226-230.
- 8 M J Booth, T Wilson. Refractive-index-induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction[J]. Journal of Biomedical Optics, 2001, 6(3): 266-272.
- 9 S F Gibson, F Lanni. Experimental test of an analytical model dimensional microscopy[J]. J Opt Soc Am A, 1991, 8(10): 1601-1613.
- 10 A Diaspro, F Fedrici, M Robello. Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy[J]. Appl Opt, 2002, 41(4): 685-690.
- 11 P Torok, P Varga, G R Booker. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: An integral representation[J]. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1995, 12(2): 325-332.

- 12 M M Corral. Point spread function engineering in confocal scanning microscopy[C]. SPIE, 2004. 112-122.
- 13 B Richards, E Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems II. structure of the image field in an aplanatic system [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1959, 253(1274): 358-379.
- 14 E Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems I. An integral representation of the image field[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1959, 253(1274): 349-357.
- 15 P Torok, P Varga. Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium[J]. Appl Opt, 1997, 36(11): 2305-2312.
- 16 P Torok, P D Higdson, T Wilson. On the general properties of polarised light conventional and confocal microscopes[J]. Opt Commun, 1998, 148(4-6): 300-315.
- 17 H Jinnai, Y Nishikawa, T Koga, *et al.*. Direct observation of three-dimensional bicontinuous structure developed via spindale decomposition[J]. Macromolecules, 1995, 28(13): 4782-4784.
- 18 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]. Journal of Materials Science, 2012, 47(7): 3429-3434.
- 19 M Hovakimyan, R Guthoff, M Reichard, *et al.*. *In vivo* confocal laser-scanning microscopy to characterize wound repair in rabbit corneas after collagen cross-linking[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2011, 39(9): 899-909.
- 20 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.

栏目编辑: 张浩佳