

CCD 探测型共聚焦显微成像横向分辨率优化

师亚琴^{1,2} 张运海¹ 肖昉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

摘要 电荷耦合器件(CCD)探测型共聚焦显微成像是近年来共聚焦成像的新方法,其成像横向分辨率除受物镜数值孔径影响外,还与成像探测方扩展函数分布区域中实际采用的 CCD 像元密切相关。用 CCD 取代传统共聚焦成像中的针孔和点探测器,选取点扩展函数分布区域中一定组合的 CCD 像元合成等效针孔,在合成针孔为不同尺寸时分别比较系统的横向分辨率,得到优化的合成针孔,通过对不同合成针孔获得的图像加权相减,实现消减成像,进一步提高横向分辨率。实验得出:当合成针孔尺寸为艾里斑直径 0.8 倍时(8 pixel×8 pixel),扫描图像同时具有较高的横向分辨率和信噪比;当用优化针孔(8 pixel×8 pixel)与较大针孔(10 pixel×10 pixel)图像加权相减时,权重系数取 0.6 时获得的消减图像横向分辨率相对于优化针孔图像提高了 21.7%。CCD 探测型共聚焦成像方法大大降低了传统共聚焦成像系统的装调难度,通过选取优化的合成针孔并进行消减成像可以提高成像的横向分辨率。

关键词 显微; 共聚焦; 消减成像; 合成针孔; 电荷耦合器件相机

中图分类号 TH742.9 文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP53.111801

Optimization of Lateral Resolution in Confocal Microscopic Imaging with CCD as a Detector

Shi Yaqin^{1,2} Zhang Yunhai¹ Xiao Yun¹

¹Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

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

Abstract In recent years, confocal microscopic imaging with charge coupled device (CCD) as a detector is a new method of confocal imaging. In this scheme, the lateral resolution of system is not only affected by the numerical aperture of the objective, but also the pixel of CCD, which is in the point spread function area of imaging and detection part. Using CCD instead of the pinhole and point detector of conventional confocal imaging, the synthetic equivalent pinhole of CCD pixel is chosen by different sizes of the point spread function area of a certain combination. The optimized synthetic pinhole is got by comparing the lateral resolution of system with different sizes of synthetic pinhole. By weighted subtracting of the image from different synthetic pinholes, subtractive imaging is realized and the lateral resolution can be enhanced. Experimental results show that when the synthetic pinhole is 0.8 times (8 pixel×8 pixel) of Airy spot diameter, the scanning image has higher lateral resolution and signal to noise ratio. When the image with the larger pinhole (10 pixel×10 pixel) is weightedly subtracted from the image with the optimized pinhole (8 pixel×8 pixel), the lateral resolution of subtractive image relative to optimized pinhole image with weight coefficient of 0.6 is improved by 21.7%. Using CCD as a detector can greatly reduce the complexity of the conventional confocal imaging system. By selecting the optimized synthetic pinhole and processing subtractive imaging, we can improve the lateral resolution of imaging.

收稿日期: 2016-06-07; 收到修改稿日期: 2016-08-10; 网络出版日期: 2016-10-20

基金项目: 国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1)、江苏省六大大人才高峰资助项目(2012-swyy-020)、苏州应用基础研究计划项目(SYG201510)

作者简介: 师亚琴(1990—),女,硕士研究生,主要从事共聚焦显微成像方面的研究。E-mail: shiyq@sibet.ac.cn

导师简介: 张运海(1975—),男,研究员,博士生导师,主要从事激光扫描共聚焦显微镜成像和超分辨显微光学方面的研究。

E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn(通信联系人)

Key words microscopy; confocal; subtractive imaging; synthetic pinhole; charge coupled device camera

OCIS codes 180.1790; 040.1520; 110.2970

1 引言

激光扫描共聚焦显微镜^[1-2]是研究微细结构的有效技术手段,是目前国内外科研单位开展生物医学研究和工业检测的重要工具。共聚焦显微镜采用精密针孔滤波技术,有效地抑制了非聚焦平面的杂散光,具有层析成像能力和很高的成像信噪比;同时系统可以沿 Z 轴方向进行断层扫描,从而实现了对较厚样本的三维成像。

为了提高共聚焦显微系统的分辨率,提出了许多成像技术,如优化光路中的针孔^[3]、不同尺寸针孔获得图像相减^[4-5]等技术。其中,消减成像技术可以通过两个图像相减实现,一个图像是在共聚焦成像的探测针孔接近艾里斑时获得,另一个图像是针孔放开时获得,两个图像相减获得的消减图像可以提高分辨率。1984年, Wilson T 等^[4]提出了差分共聚焦成像方法,在扫描显微镜中,用共聚焦探测图像减去针孔放开时探测图像,提高系统的分辨率。2003年, Heintzmann R 等^[6]用蔡司共聚焦显微镜实现了两个不同尺寸针孔下的图像相减,提高了显微镜的分辨率。2013年, Wang Y F 等^[7]搭建了有两个不同尺寸针孔的共聚焦系统,并通过图像相减提高了分辨率。目前,消减成像技术都是通过两套针孔不同的共聚焦系统实现的,为了得到两个不同尺寸针孔的图像,共聚焦系统中需要设置两个针孔及相应的点探测器,系统复杂度较高,装调难度较大。

传统共聚焦显微镜在成像探测方设置一个针孔和点探测器^[8],针孔位于成像焦面位置处,点探测器常采用光电倍增管(PMT)或雪崩二极管(APD),为了实现共聚焦成像,针孔必须准确地和成像探测方点扩展函数(PSF)分布区域重合,由于针孔尺寸较小,常取为 1 倍艾里斑直径,共聚焦成像的光学装调难度较大。电荷耦合器件(CCD)探测型共聚焦显微成像是近年来共聚焦成像的新方法。1998年,田维坚等^[9]采用 CCD 像元形成虚拟针孔取代传统共聚焦显微镜中的针孔直接截取三维信息光强,并重建图像。2010年, Müller C B 等^[10]在结构光照明共聚焦显微镜中用 CCD 实现了图像扫描显微镜。2013年, Schulz O^[11]用 CCD 探测器实现了转盘式共聚焦图像扫描显微镜,提高了分辨率。CCD 作为共聚焦显微镜的探测器,只需要将 CCD 的感光面设置在传统共聚焦成像的针孔位置处,取代传统共聚焦成像中的针孔和点探测器,选取点扩展函数覆盖区域中一定组合的 CCD 像元合成等效针孔,由于 CCD 的感光区域较大,CCD 探测型共聚焦成像的装调难度大大降低了。合成等效针孔的 CCD 像元采集到的光信号进行图像重建就可以获得共聚焦图像。CCD 探测型共聚焦成像可以方便地得到激光照明光斑和样本的明场图像,这使得选择合成针孔尺寸和定位样本扫描区域易于实现。除 CCD 可用于共聚焦成像的探测器外,其他类型的面阵探测器如互补金属氧化物半导体(CMOS)相机也适用。

本文搭建了 CCD 探测型共聚焦显微系统,CCD 的感光面由多个像元组成,选择其中少量像元可以形成合成针孔,而且可以通过简单地增加或减少选择的像元数来改变合成针孔的尺寸。实验中选取点扩展函数覆盖区域中不同组合的 CCD 像元合成等效针孔,对金粒子进行扫描成像,测量系统的点扩展函数,并与传统共聚焦显微镜分辨能力进行对比。在 CCD 探测型共聚焦显微镜系统的基础上,实现消减成像不需要两个采集设备,只要通过选择不同组合的像元就可以形成不同尺寸合成针孔的共聚焦系统,大大降低了系统复杂度,对不同尺寸合成针孔的图像进行加权相减,能够提高共聚焦成像横向分辨率。

2 合成针孔与消减图像生成方法

基于 CCD 探测的共聚焦显微成像系统,如图 1 所示,与传统共聚焦成像不同的是,CCD 感光面设置在针孔位置,取代传统共聚焦成像中的针孔和点探测器(PMT 或 APD)。激光经过 L1 和 L2 准直扩束后被二色镜反射,经过会聚透镜和筒镜透镜进入物镜,聚焦在样本上,样本反射的光被物镜收集,沿原路返回穿过二色镜后,探测透镜将反射光聚焦在 CCD 感光面上。

由于 CCD 感光面位于成像探测方的焦面位置处,可获得成像探测点扩展函数的二维图像,如图 2 所示,选取点扩展函数分布区域中不同组合的 CCD 像元合成等效针孔,图 2 是尺寸为 4 pixel×4 pixel 和 6 pixel×6 pixel 的合成针孔示意图,白色格子代表 CCD 感光面上的光斑,每个格子代表一个像元。共聚焦成像时,照明激光在样本上聚焦成一个照明光点,通过振镜扫描或者样品台移动,将照明激光点相对于样本进行逐点逐行

移动,在照明激光点停留的每个位置处,将 CCD 合成针孔中的像素值进行求和,将求和值作为当前激光照明位置处的样本共聚焦图像像素值,由于求和值会超出最大像素灰度值 255,实际使用时将像素值求和后再做平均作为样本当前位置共聚焦图像的像素值。此外,用 CCD 相机像元合成的针孔既可以是方形,也可以是圆形或其他形状。

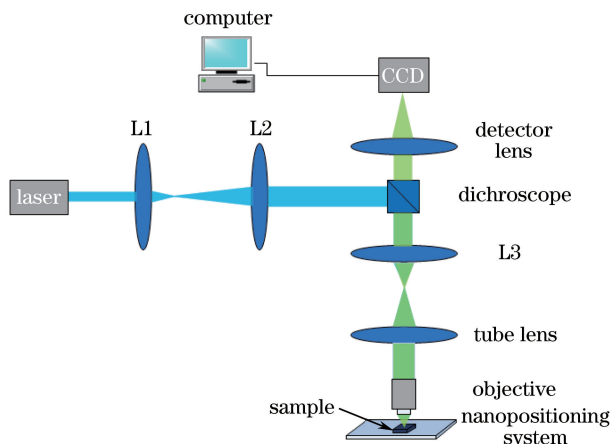


图 1 CCD 探测型共聚焦系统原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of confocal microscopy with CCD camera as a detector

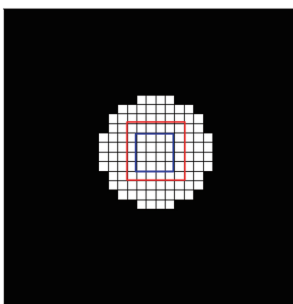


图 2 合成针孔示意图:白色区域代表 CCD 感光面上的光斑,每个格子代表 CCD 上的一个像元,

蓝色方框内的像元形成 $4 \text{ pixel} \times 4 \text{ pixel}$ 的合成针孔,红色方框内的像元形成 $6 \text{ pixel} \times 6 \text{ pixel}$ 的合成针孔

Fig. 2 Schematic diagram of synthetic pinholes: White area is the spot in photosurface of CCD and each grid represents a pixel in CCD. The region of blue line is a $4 \text{ pixel} \times 4 \text{ pixel}$ pinhole and the region of red line is a $6 \text{ pixel} \times 6 \text{ pixel}$ pinhole

在共聚焦显微镜中,点扩展函数能有效地估计共聚焦系统横向分辨率。共聚焦显微镜的有效点扩展函数 H_{eff} 可以表示为^[12]

$$H_{\text{eff}}(x, y) = H_{\text{exc}}(x, y) \times H_{\text{fluo}}(x, y) \otimes D(x, y), \quad (1)$$

式中, $H_{\text{exc}}(x, y)$ 是照明点扩展函数, $H_{\text{fluo}}(x, y)$ 是物镜探测点扩展函数, $D(x, y)$ 表示针孔函数, $H_{\text{eff}}(x, y)$ 是共聚焦显微镜的有效点扩展函数, \otimes 表示卷积算法。共聚焦显微镜的针孔越小,其有效点扩展函数就越小,成像分辨率越高。但是针孔太小会影响共聚焦系统的信噪比,针孔越小,信噪比越低。

在传统共聚焦显微成像中,设置不同尺寸的针孔,共聚焦显微系统的有效点扩展函数不同^[13],分别对物体扫描成像,可以获得不同的共聚焦图像。由于两幅图像相减相当于两个点扩展函数相减,因此对在不同针孔下获得的图像线性相减,可以得到更小的系统有效点扩展函数 $H_{\text{eff}}(x, y)$,从而提高共聚焦显微镜的分辨率。这种线性相减的方法需要一个大针孔和一个小针孔,小针孔的有效点扩展函数 H_{closed} 包含了大部分的焦点光和少部分的离焦光,大针孔的点扩展函数 H_{open} 中的离焦光比小针孔的要多,通过两种针孔的点扩展函数相减可以将 H_{closed} 中的离焦光去除,获得更小的消减点扩展函数 H_{sub} ,提高小针孔共聚焦显微镜的横向分辨率。线性消减成像点扩展函数表示为

$$H_{\text{sub}} = H_{\text{closed}} - \alpha H_{\text{open}}, \quad (2)$$

$$H_{\text{closed}} = H_{\text{exc}}(x, y) \times H_{\text{fluo}}(x, y) \otimes D_{\text{small}}(x, y), \quad (3)$$

$$H_{\text{open}} = H_{\text{exc}}(x, y) \times H_{\text{fluo}}(x, y) \otimes D_{\text{big}}(x, y), \quad (4)$$

式中, α 是权重系数, $D_{\text{small}}(x, y)$ 和 $D_{\text{big}}(x, y)$ 分别是小针孔和大针孔的针孔函数。在采用 CCD 作为共聚焦成像的探测器时, 由于合成针孔大小可以方便设置, 消减成像更容易实现。为得到消减后的点扩展函数 H_{sub} , 用由 $N_1 \times N_1$ 个有效像元合成的针孔获得一幅共聚焦图像, 其点扩展函数记为 H_{closed} ; 同时, 选择更多的有效像元 $N_2 \times N_2$ 作为合成针孔, 可以获得另一幅共聚焦图像, 其点扩展函数记为 H_{open} ; 最终, 通过两幅图像相减, 得到消减后的点扩展函数 H_{sub} 。

为了证明消减成像能够减小系统有效点扩展函数, 对一个理想物点成像, 并进行理论计算分析。此时, 获得的图像为系统的有效点扩展函数。根据实验条件, 在仿真计算中参数设置如下: 小针孔为 0.8 倍艾里斑直径, 大针孔为 1 倍艾里斑直径, 激发波长 488 nm, 荧光波长为 525 nm, 物镜数值孔径(NA)为 1.4。在仿真过程中, 两幅共聚焦图像的强度经过归一化, 强度的最大值相同。图 3 是 α 分别为 0.4、0.5、0.6、0.7 时, 仿真计算的消减成像归一化点扩展函数。图中红色曲线是消减后有效点扩展函数 H_{sub} , 黑色曲线是直径较小的合成针孔时的 H_{closed} , 蓝色曲线是直径较大的合成针孔时的 H_{open} , 从图中可以看出随着消减系数的增大消减后的 H_{sub} 越来越窄, 但同时出现了很多小于 0 的值, 在实际应用中出现过多的负值会造成图像的失真。根据仿真数据, 为了在减小点扩展函数的同时不产生过多的负值, 权重系数 $\alpha = 0.5$ 是两幅仿真共聚焦图像消减成像的最优消减系数。

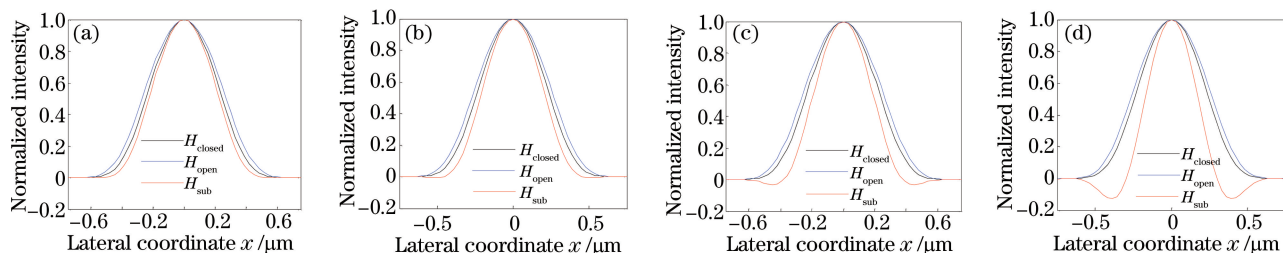


图 3 不同权重系数下消减图像的点扩展函数。(a) $\alpha = 0.4$; (b) $\alpha = 0.5$; (c) $\alpha = 0.6$; (d) $\alpha = 0.7$

Fig. 3 PSFs of subtraction images at different weight coefficients. (a) $\alpha = 0.4$; (b) $\alpha = 0.5$; (c) $\alpha = 0.6$; (d) $\alpha = 0.7$

在消减成像过程中, 消减系数 α 对成像结果很重要, α 值越大, 消减后 H_{sub} 中出现的负值越多, 从而导致图像失真。在实验过程中, 需要根据具体情况来选择适当的消减系数 α 。

3 CCD 探测型共聚焦显微成像实验结果

搭建了 CCD 探测型共聚焦显微成像系统如图 4 所示, 半导体激光器(488 nm, 维林光电)发出 488 nm 波长激光, 经过准直扩束后, 入射光经过二色镜反射、经过中继透镜和筒镜透镜后进入物镜($NA = 1.4$, $100\times$, Olympus), 之后聚焦于样品。随后, 样品反射或散射的光沿原光路返回, 并穿过二色镜, 经探测透镜聚焦于探测器 EMCCD(ixon3860, ANDOR), CCD 感光面处于探测透镜的焦面, 与物镜焦面共轭。EMCCD

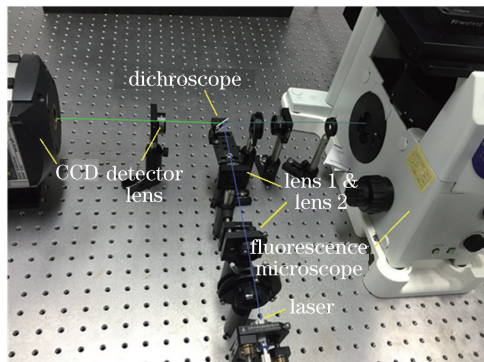


图 4 CCD 探测型共聚焦实验系统图

Fig. 4 Experimental system of confocal microscopy with CCD camera as a detector

的像元大小 $24\ \mu\text{m}$,感光面由 $128\ \text{pixel}\times 128\ \text{pixel}$ 组成。通过三维纳米位移台(p517, Physik Instrumente)带动样本实现扫描成像,位移台移动范围 $200\ \mu\text{m}$,步进最小为 $1\ \text{nm}$ 。用 Labview 软件编写了一个成像控制程序,可以自由设置 CCD 曝光时间,合成针孔的有效像元个数等。

3.1 共聚焦成像实验

与传统显微成像相比,共聚焦显微成像具有较高的横向分辨率和层析能力。为了实现 CCD 共聚焦显微成像,首先采用平面镜作为样品,确定合成针孔在 CCD 感光面中的位置,CCD 成像出平面镜反射的激光光斑,选择光斑的中心作为合成针孔中心的位置;然后,采用较常使用的纳米量级的金粒子对光斑扫描成像,每个金粒子的像即为系统的点扩展函数,并比较不同针孔下的系统有效点扩展函数。

在本实验中,采用直径为 $100\ \text{nm}$ 的金粒子(小于光斑直径)作为样本。为了确定扫描成像区域,在明场照明下,通过 CCD 观察确定样本中金粒子的位置,确定扫描成像区域,将扫描区域的大小定为 $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$ 。随后采用 $488\ \text{nm}$ 激光作为入射光对金粒子进行照射,移动金粒子对入射光斑进行扫描,并通过控制 CCD 的有效像元合成针孔,实现 CCD 共聚焦成像,其中有效像元分别为 $6\ \text{pixel}\times 6\ \text{pixel}$ 、 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 、 $10\ \text{pixel}\times 10\ \text{pixel}$ 、 $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$ 合成针孔下的金粒子横向扫描图像如图 5 所示。

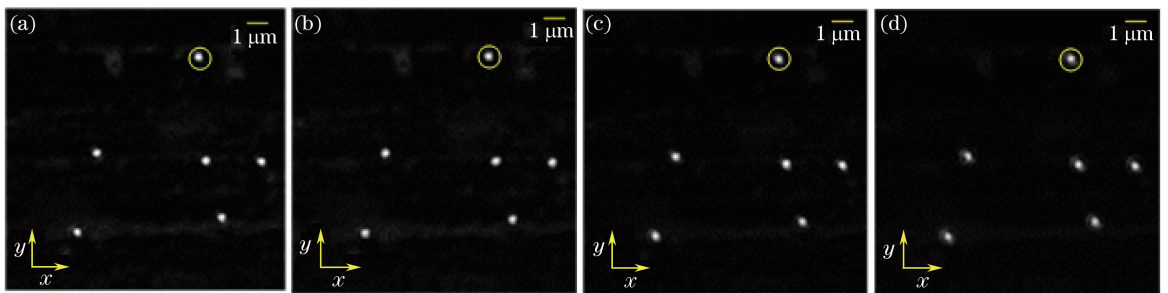


图 5 不同尺寸合成针孔时 $100\ \text{nm}$ 金粒子横向扫描图。(a) $6\ \text{pixel}\times 6\ \text{pixel}$;(b) $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$;(c) $10\ \text{pixel}\times 10\ \text{pixel}$;(d) $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$

Fig. 5 Lateral scanning image of $100\ \text{nm}$ gold particles with different size synthetic pinholes. (a) $6\ \text{pixel}\times 6\ \text{pixel}$;(b) $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$;(c) $10\ \text{pixel}\times 10\ \text{pixel}$;(d) $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$

传统共聚焦成像时,为平衡信噪比和分辨率,针孔尺寸一般取为 1 倍艾里斑直径,即

$$D_{\text{Airy}} = \frac{1.22\lambda}{V_{\text{NA}}}M, \quad (5)$$

式中, λ 是被收集的光波长, M 是成像系统的放大倍率, V_{NA} 为物镜的数值孔径。对于本实验系统, $D_{\text{Airy}} = 255.2\ \mu\text{m}$,对应 CCD 上 $10\ \text{pixel}\times 10\ \text{pixel}$ 。传统共聚焦显微镜在针孔为 1 倍艾里斑直径时的分辨能力为 $\frac{0.5\lambda}{V_{\text{NA}}} = 174\ \text{nm}$ 。经过测量实验中合成针孔为 $10\ \text{pixel}\times 10\ \text{pixel}$ 的金粒子半峰全宽,得到系统的分辨能力为 $180\ \text{nm}$,与传统共聚焦显微镜的分辨能力非常接近。

为了获得最佳的合成针孔,需要对不同合成针孔下金粒子的大小进行比较分析。选择其中一个金粒子分析(图 5 中黄色线圈中的金粒子),图 6 是不同尺寸合成针孔下金粒子水平方向上的归一化强度拟合图,尺寸小于 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 时曲线相差很小,说明分辨率减小的趋势变缓。合成针孔尺寸越小,系统的信噪比差,为了平衡分辨率和信噪比,选择了有效的 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 作为优化的合成针孔,该优化针孔是艾里斑直径的 0.8 倍。

轴向扫描金粒子可以观察系统的层析成像能力。在明场照明成像时,通过 CCD 对金粒子的成像,能够确定光斑附近只有一个金粒子。分别用有效的 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 的针孔和 $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$ 的针孔对金粒子进行轴向扫描成像,扫描区域为 $4\ \mu\text{m}\times 4\ \mu\text{m}$,扫描图像如图 7 所示。针孔尺寸为 $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$ 相当于宽场成像,光斑周围有很多杂散光; $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 时,光斑周围的杂散光减少很多,这表明 CCD 探测型共聚焦成像和传统共聚焦成像一样对非焦平面杂散光有较强的抑制作用,成像将具有层析特性。图 8 是两个尺寸的针孔下金粒子轴向方向上(图 7 中红线指示)的归一化强度拟合图,可以看出 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$ 合成针孔下半峰全宽比 $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$ 下的半峰全宽要窄一些。

为了验证 CCD 共聚焦系统的层析能力,对南瓜花粉进行荧光成像。在实验系统的探测光路中加入滤色片,滤除掉激光,仅允许荧光通过,样本换成南瓜花粉。通过纳米位移台沿光轴方向改变样本位置,一层扫描成像结束后沿轴向移动 $2.5\ \mu\text{m}$ 进入下一层成像,合成针孔尺寸为 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$,轴向位置分别为 $0, 2.5, 5, 7.5, 10\ \mu\text{m}$ 处的花粉扫描图像如图 9 所示。可以看出花粉层与层之间图像特征变化明显,表明成像系统具有层析成像能力。

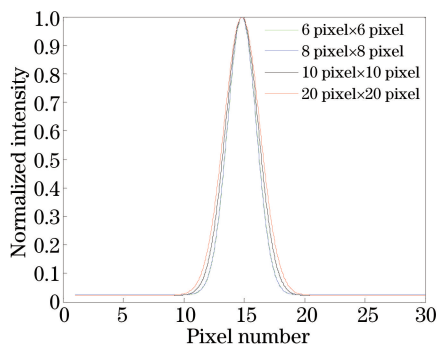


图 6 不同尺寸合成针孔时 $100\ \text{nm}$ 金粒子的归一化强度图

Fig. 6 Normalized intensity of $100\ \text{nm}$ gold particles with different size synthetic pinholes

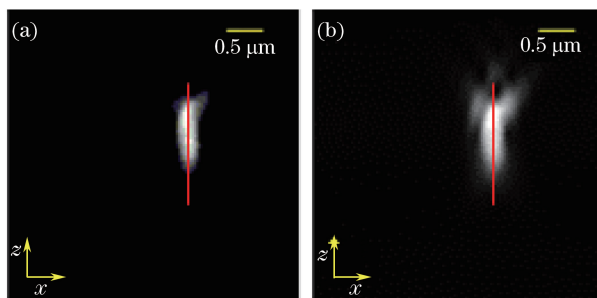


图 7 不同尺寸合成针孔时 $100\ \text{nm}$ 金粒子轴向扫描图像。(a) $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$; (b) $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$

Fig. 7 Axial scanning image of $100\ \text{nm}$ gold particles with different size synthetic pinholes. (a) $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$; (b) $20\ \text{pixel}\times 20\ \text{pixel}$

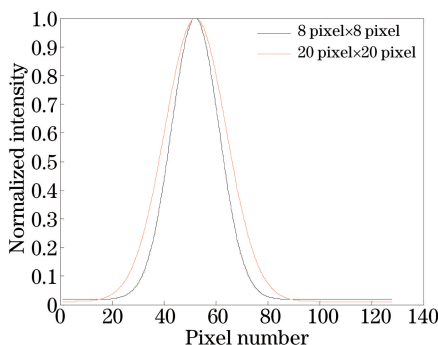


图 8 $100\ \text{nm}$ 金粒子轴向方向上的归一化强度图

Fig. 8 Axial normalized intensity of $100\ \text{nm}$ gold particles with different size synthetic pinholes

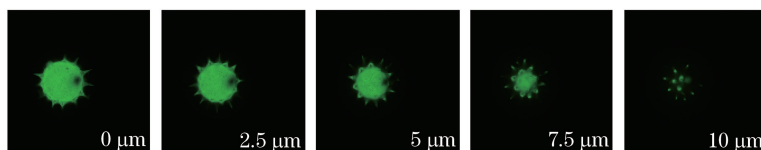


图 9 南瓜花粉的分层扫描图像

Fig. 9 Section scanning images of pumpkin pollen

3.2 消减成像实验

在消减成像实验中,小针孔选择优化的 $8\ \text{pixel}\times 8\ \text{pixel}$,大针孔是与艾里斑直径对应的 $10\ \text{pixel}\times$

10 pixel合成针孔,图 10 是 8 pixel \times 8 pixel 和 10 pixel \times 10 pixel 合成针孔下的 100 nm 金粒子横向扫描图像以及不同消减权重系数的消减图像。在实验过程中,将消减图像出现的负值设置为 0。可以看出消减图像中金粒子光斑有所变小,且随着权重系数 α 增大这种变化趋势越明显,表明消减图像的分辨率随着 α 的增加而提高,但图像强度值在逐步减小。图 10(f)中,因为 α 值比较大,图像中被设置成 0 的负值很多,使得金粒子本身的信息丢失严重,导致金粒子成像不完整,甚至金粒子消失,说明金粒子图像失真。在生物样本成像时,通过判断消减后样本信息完整情况来确定图像是否失真。

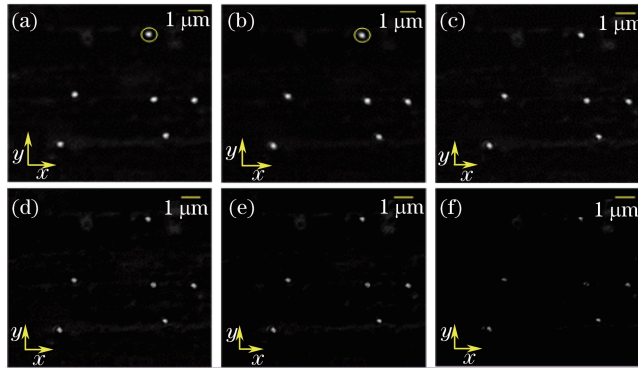


图 10 不同消减权重系数下 100nm 金粒子消减图像。(a)和(b)分别是 8 pixel \times 8 pixel 和 10 pixel \times 10 pixel 像元合成针孔下的金粒子图像;(c)~(f)是不同权重系数下的消减图像($\alpha=0.5,0.6,0.7,0.8$)

Fig. 10 Subtraction images of 100 nm gold particles with different subtraction coefficients.

(a) and (b) are 8 pixel \times 8 pixel and 10 pixel \times 10 pixel synthetic pinhole, respectively; (c)~(f) are subtraction images at different weight coefficients ($\alpha=0.5, 0.6, 0.7, 0.8$)

不同消减权重系数下金粒子光斑归一化强度分布曲线如图 11 所示(选择图 10 中黄色线圈内的金粒子光斑,沿水平方向)。从图中可以看出消减后的曲线随着 α 的增大不断变窄,而消减曲线的最小值随着 α 的增大向小于 0 的方向移动,与前面的理论分析一致。

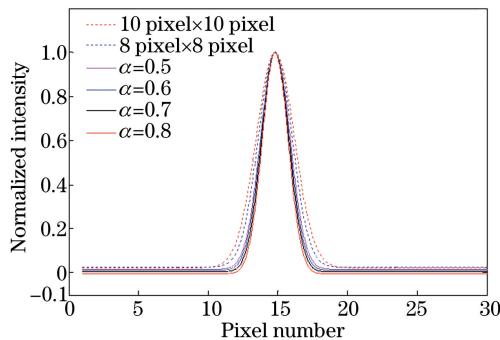


图 11 不同权重系数下消减图像中 100 nm 金粒子的归一化强度图

Fig. 11 Normalized intensities of 100 nm gold particles in subtraction images with different weight coefficients

消减图像中的负值可以简单地通过设置成零来去除,但负值过多会导致图像失真^[14],因此,要避免产生过多的负值。消减权重系数 α 使得大针孔图像强度为小针孔图像强度的一半时^[7],能够在提高横向分辨率的同时不产生过多的图像像素负值。在实验过程中,准确的消减权重系数 α 是通过观察横向分辨率以及图像像素负值来获得。根据金粒子成像实验数据以及不同消减系数的图像像素负值情况,选择权重系数 α 为 0.6,使 10 pixel \times 10 pixel 合成针孔的图像强度降到 8 pixel \times 8 pixel 合成针孔图像强度的一半左右,此时得到的消减图像的负值较少,而消减图像的点扩展函数半峰全宽相对消减前 8 pixel \times 8 pixel 合成针孔图像点扩展函数半峰全宽缩小了 21.7%。

为了进一步验证消减成像可以提高共聚焦显微镜的横向分辨率,在搭建的 CCD 探测型共聚焦显微镜探测光路中加入滤色块,对老鼠肾脏切片(Molecular Probes, Fluo Cells prepared slide #3)进行荧光扫描成像。采用波长为 488 nm 的激光,激发麦胚凝集素染色的老鼠肾脏肾小球和肾曲小管,发射出绿色荧光。随

后对老鼠肾脏样品进行共聚焦荧光扫描成像,其扫描范围为 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 。根据金粒子实验结果,选择 $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 合成小针孔, $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ 合成大针孔。对获得的两幅共聚焦图像进行线性消减,根据扫描老鼠肾脏得到的实验数据,为了平衡分辨率和图像像素负值,在消减过程中选择的权重系数为 0.26,消减结果如图 12 所示。图中(a)和(b)分别是 $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 合成针孔和 $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ 合成针孔下老鼠肾脏细胞的共聚焦图像,(c)是经过消减后的老鼠肾脏图像。从图 12 中可以看到,消减图像比两种针孔下的共聚焦图像更清楚,以图中红方框区域为例,(a)和(b)中红方框区域内细胞微丝都无法区分,(c)中红方框区域内细胞微丝很明显被区分开来,这说明了消减图像的分辨率比有效的 $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 合成针孔的共聚焦图像的分辨率要好。因此,实验结果证明了消减成像能够有效地提高共聚焦显微镜的分辨率。

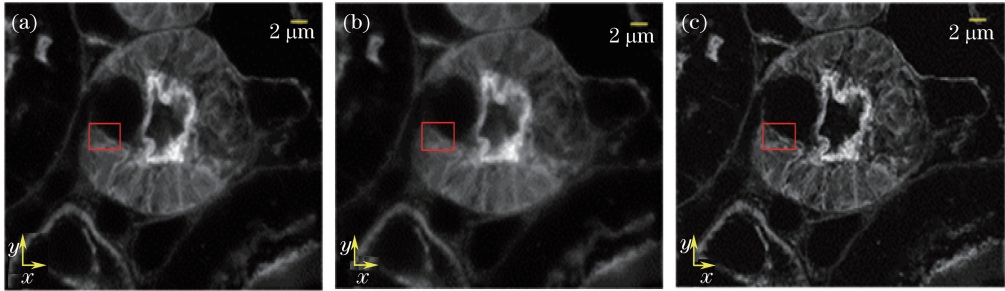


图 12 老鼠肾脏的共聚焦消减图像。(a)和(b) $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 和 $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ 像元合成针孔下老鼠肾脏的共聚焦图像;(c) $\alpha=0.26$ 时老鼠肾脏的消减图像

Fig. 12 Confocal subtraction images of mouse kidney cells. (a) and (b) confocal subtraction images of mouse kidney cells in $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ and $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ synthetic pinhole, respectively; (c) subtraction images of mouse kidney cells at $\alpha=0.26$

4 结 论

搭建了 CCD 探测型共聚焦显微成像系统,选取成像探测方点扩展函数分布区域中一定组合的 CCD 像元合成等效针孔,采用不同尺寸的合成针孔,对 $100\ \text{nm}$ 金粒子进行扫描成像,并对金粒子强度曲线进行分析,得出当合成针孔尺寸为艾里斑直径 0.8 倍时 ($8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$),扫描图像同时具有较高的横向分辨率和信噪比。将 $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 的优化针孔与较大的 $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ 针孔得到的金粒子扫描图像加权相减,当权重系数取 0.6 时,得到的消减图像负强度值较少,图像的分辨率提高了 21.7%。为了更直观地观察消减成像能够提高分辨率,以老鼠肾脏为样本进行荧光扫描成像,在 $8\ \text{pixel} \times 8\ \text{pixel}$ 的优化针孔与较大的 $10\ \text{pixel} \times 10\ \text{pixel}$ 像元针孔下得到两幅老鼠肾脏扫描图像,取权重系数 0.26 进行消减成像,得到了分辨率较高的老鼠肾脏图像。采用 CCD 像元组合生成合成针孔的方法同时还保证了系统成像时的层析能力。CCD 探测型共聚焦成像方法大大降低了传统共聚焦成像系统的装调难度,通过选取优化的合成针孔并进一步进行消减成像可以提高成像的横向分辨率。除 CCD 可用于共聚焦成像的探测器外,其他类型的面阵探测器如 CMOS 相机也适用。

参 考 文 献

- Zhang Yunhai, Yang Haomin, Kong Chenhui. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy[J]. Optics and Precision Engineer, 2014, 22(6): 1446-1453.
张运海, 杨皓旻, 孔晨晖. 激光扫描共聚焦光谱成像系统[J]. 光学精密工程, 2014, 22(6): 1446-1453.
- Wei Tongda. Key technologies research in confocal laser scanning microscopy[D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2014.
魏通达. 共聚焦激光扫描光学显微成像关键技术研究[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2014.
- Boyer G. New class of axially apodizing filters for confocal scanning microscopy[J]. J Opt Soc Am A, 2002, 19(3): 584-589.
- Wilson T, Hamilton D K. Difference confocal scanning microscopy[J]. Journal of Modern Optics, 1984, 31(4): 453-465.

- 5 Hao X, Kuang C F, Gu Z T, *et al.* Optical super-resolution by subtraction of time-gated images[J]. *Opt Lett*, 2013, 38(6): 1001-1003.
- 6 Heintzmann R, Sarafis V, Munroe P, *et al.* Resolution enhancement by subtraction of confocal signals taken at different pinhole sizes[J]. *Micron*, 2003, 34(6): 293-300.
- 7 Wang Y F, Kuang C F, Gu Z T, *et al.* Image subtraction method for improving lateral resolution and SNR in confocal microscopy[J]. *Opt Laser Technol*, 2013, 48: 489-494.
- 8 Davidovits P, Egger M D. Scanning laser microscope for biological investigations[J]. *Appl Opt*, 1971, 10(7): 1615-1619.
- 9 Tian Weijian, Ding Zhihua, Guo 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.
- 10 Müller C B, Enderlein J. Image scanning microscopy[J]. *Phys Rev Lett*, 2010, 104(19): 198101.
- 11 Schulz O, Pieper C, Clever M, *et al.* Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy[J]. *P Natl Acad Sci Usa*, 2013, 110(52): 21000-21005.
- 12 Gu M, Sheppard C J R. Confocal fluorescent microscopy with a finite-sized circular detector[J]. *J Opt Soc Am A*, 1992, 9(1): 151-153.
- 13 Xiao Yun, Zhang Yunhai, Wu Xiaodong, *et al.* Model of laser scanning confocal microscopy for three media[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(4): 041701.
肖 昀, 张运海, 武晓东, 等. 三层介质中激光扫描共聚焦显微镜的模型[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(4): 041701.
- 14 Hewlett S J, Wilson T. Resolution enhancement in three-dimensional confocal microscopy[J]. *Machine vision and applications*, 1991, 4(4): 233-242.