

荧光共焦扫描系统成像特性的优化*

张 平 吴 震 王翠英 向际鹰

(华中理工大学光电子工程系, 武汉 430074)

摘 要 对荧光共焦扫描系统用光强点扩散函数进行傅里变换得到系统三维传递函数的数学模型, 并由此求得环形透镜和各种有限大小探测器系统的光学传递函数。用计算机模拟和光学传递函数数值计算, 分析了采用不同环形透镜及探测器对系统成像特性的影响。

关键词 荧光, 三维成像, 共焦扫描, 传递函数。

1 引 言

由于荧光共焦扫描显微术具有独特的纵向分辨能力和很高的横向分辨率, 因此可对生物体成三维超分辨率的图像, 这是集光学、精密机械、电子、控制、计算机及光学图像处理技术于一体的高新技术。本文对系统进行三维光学传递函数数值计算, 分析了系统的三维成像特性, 研究了探测器有限尺寸、透镜形状和采用不同组合时系统获得的分辨率。

在实际系统中, 为增强接收到被激发的微弱荧光信号, 需增大点探测尺寸, 然而使用大的针孔将导致光学层析性能和信噪比的下降, 分析表明使用环形透镜代替圆形透镜可改善光学层析的强度并提高轴向分辨率, 合适地选择环形透镜和点探测器的尺寸可获得最佳的系统匹配形式。

2 荧光共焦扫描三维系统成像理论

激光共焦扫描荧光显微系统是用相干光(激光)进行照明, 用激光激发出的非相干光(荧光)进行成像, 这是一种混合成像系统, 基本光路如图 1 所示, 光源发出的光经透镜 P_1 聚焦在物面 t 上, 激发出的荧光再经透镜 P_2 成像在探测面 D 上。光源复振幅分布函数为 S , 探测器函数为 D 。为便于讨论, 假设荧光波长等于激光波长, 并假设物体对激光的吸收可以忽略, 则整个系统的光强响应为:

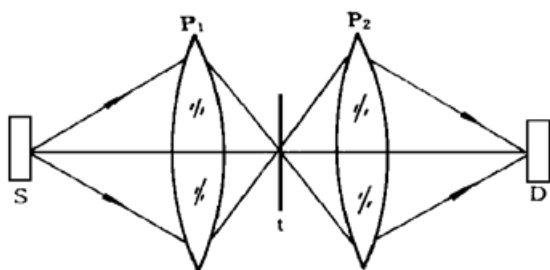


Fig. 1 Scheme of confocal optical system

$$I = \{ |S(v, w, u) \otimes_3 h_1(v, w, u)|^2 \} \{ |h_2(v, w, u)|^2 \otimes_3 D(v, w, u) \} \quad (1)$$

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996 年 2 月 9 日; 收到修改稿日期: 1996 年 5 月 6 日

式中, 第一大括号为到达物面的光强, 第二个大括号内为探测面接收到的光强, \odot_3 为三维卷积, $h_1(v, w)$ 和 $h_2(v, w)$ 分别为透镜 P_1 和 P_2 的振幅点扩散函数, v, w, u 为光学坐标(是以波长为单位, 并综合考虑数值孔径的影响后对几何坐标的一种转换形式)。

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} x \sin \alpha, \quad w = \frac{2\pi}{\lambda} y \sin \alpha, \quad u = \frac{2\pi}{\lambda} z \sin^2 \alpha, \quad (\sin \alpha \text{ 为数值孔径})$$

2.1 二维成像

对处于物镜焦平面薄生物试样的成像特性可用 2 维光学传递函数进行描述。将(1)式中三维形式改成二维形式, 则整个系统的光强响应函数为:

$$I = \{ |s(v, w, u) \odot_2 h_1(v, w, u)|^2 \} \{ |h_2(v, w, u)|^2 \odot_2 D(v, w, u) \} \quad (2)$$

式中

$$h_i(v, w) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} P_i(\zeta, \eta) \exp [j(\zeta v + \eta w)] d\zeta d\eta, \quad (i = 1, 2) \quad (3)$$

$P_i(\zeta, \eta)$ 为透镜瞳函数; 若 a 为光瞳半径, 则有 $\zeta = x/a, \eta = y/a$ 。一般光学系统采用圆形透镜, 假设 P_1 和 P_2 具有相同的圆瞳函数 P , 即

$$P(\zeta, \eta) = \begin{cases} 1 & \sqrt{\zeta^2 + \eta^2} \leq 1 \\ 0 & \text{其它} \end{cases} \quad (4)$$

振幅点扩散函数为:

$$h(v, w) = 2J_1(\sqrt{v^2 + w^2}) / \sqrt{v^2 + w^2} \quad (5)$$

式中 J_1 为一阶第一类贝塞尔函数。将(5)式代入(2)式可得圆形透镜光学系统的光强响应:

$$I(v, w) = \left\{ \left| S(v, w) \odot_2 \frac{2J_1(\sqrt{v^2 + w^2})}{\sqrt{v^2 + w^2}} \right|^2 \right\} \left\{ \left| \frac{2J_1(\sqrt{v^2 + w^2})}{\sqrt{v^2 + w^2}} \right|^2 \odot_2 D(v, w) \right\} \quad (6)$$

式中光源一般采用点源 $S(v, w) = \delta(v, w)$ 。常用如下二种探测器和点源组合。

1) 点源点探测

$$I(v, w) = \left[2J_1(\sqrt{v^2 + w^2}) / \sqrt{v^2 + w^2} \right]^4 \quad (7)$$

2) 点源圆形探测器, r 为探测器半径。

$$I(v, w) = \left[2J_1(\sqrt{v^2 + w^2}) / \sqrt{v^2 + w^2} \right]^2 \left\{ \left[2J_1(\sqrt{v^2 + w^2}) / \sqrt{v^2 + w^2} \right]^2 \odot_2 \text{circ}(\sqrt{v^2 + w^2}/r) \right\} \quad (8)$$

若采用环形透镜时, ϵ 为内外径之比

$$P(\zeta, \eta) = \begin{cases} 1 & \epsilon \leq \sqrt{\zeta^2 + \eta^2} \leq 1 \\ 0 & \text{其它} \end{cases} \quad (9)$$

可得环形透镜系统的光强响应:

$$I(v, w) = \left[\frac{2J_1(\sqrt{v^2 + w^2}) - 2J_1(\epsilon \sqrt{v^2 + w^2})}{\sqrt{v^2 + w^2}} \right]^4 \quad (10)$$

对上述公式进行数值计算, 通过分析可得出在共焦系统中使用点光源和点探测器获得最佳的横向分辨率, 使用环形透镜可进一步提高分辨率, 使用圆形有限大小探测器系统使分辨

率降低。

2.2 三维光学传递函数^[1]

描述系统成像特性的重要参数之一是系统的光学传递函数，光学传递函数是系统光强点扩散函数的傅里叶变换，对(1)式进行傅里叶变换即可得到系统的三维光学传递函数：

$$C(l, s) = F_3\{|h_1|^2 |h_2|^2\} = F_3[h_1^2] \otimes_3 F_3[h_2^2] \tag{11}$$

其中 l, s 分别是 v, u 的空间频率， F_3 为三维傅里叶变换。

实际系统中使用 $D(v, w) = \text{circ}(\sqrt{v^2 + w^2}/vd)$ 的圆形探测器，则整个系统的传递函数形式为：

$$C(l, s) = F_3[h_1^2] \otimes_3 \{F_3[h_2^2] F_2[D(v, w)]\} \tag{12}$$

为了求得环形透镜的传递函数，首先要计算出式中的 $F(h^2)$ ，设

$$C'(l, s) = F(h^2) \tag{13}$$

由傅里叶光学可知 $F_2[h(v, w)] = P(l)$ 。 F_2 为二维傅里叶变换，在二维情况下有：

$$\begin{aligned} F_2(|h(v, w)|^2) &= F_2[h(v, w) h^*(v, w)] = F_2[h(v, w)] \otimes_2 F_2[h^*(v, w)] \\ &= P(l) \otimes_2 P^*(l) \end{aligned} \tag{14}$$

上式*代表求共轭复数。为得到三维傅里叶变换，需将瞳函数 $P(l)$ 改写成三维形式

$$p(l, u) = \begin{cases} \exp(i \frac{u}{2} \rho^2) & \epsilon \leq \rho \leq 1 \\ 0 & \text{其它} \end{cases} \tag{15}$$

对(13)式在 u 方向进行傅里叶变换，忽略常数因子有：

$$C'(l, s) = \int_{-\infty}^{\infty} [P(l, u) \otimes_2 P^*(l, u)] \exp(-ius) du \tag{16}$$

$$P(l, u) \otimes_2 P^*(l, u) = \iint_A \exp(i \frac{u}{2} l_1^2) \exp(-i \frac{u}{2} l_2^2) dx dy \tag{17}$$

$$\text{式中 } l_1^2 = y^2 + (x + 0.5l)^2, \quad l_2^2 = y^2 + (x - 0.5l)^2 \tag{18}$$

A 为卷积的重叠面积，见图 2 的阴影部分。

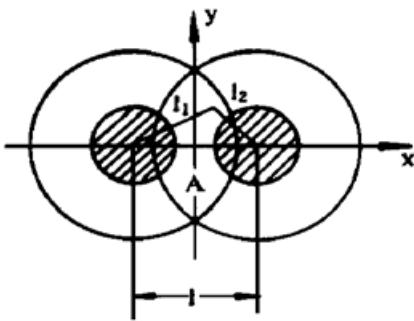


Fig. 2 Scheme of convolution

将(18)式代入(17)式有：

$$\begin{aligned} P(l, u) \otimes_2 P^*(l, u) &= \iint_A \exp[i \frac{u}{2} (l_1^2 - l_2^2)] dx dy \\ &= \iint_A \exp(iu x l) dx dy \end{aligned} \tag{19}$$

将(19)式代入(16)式，然后交换积分次序，得：

$$\begin{aligned} C'(l, s) &= \int_{-\infty}^{\infty} [\iint_A \exp(iu x l) dx dy] \exp(-ius) du \\ &= \iint_A \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \exp[iu(xl - s)] du \right\} dx dy \\ &= \iint_A \delta(s - lx) dx dy = (1/l) \int_{x=s/l} dy \end{aligned} \tag{20}$$

(20)式的几何描述为： $x = s/l$ 处在积分区域 A 内的 Y 方向线段长度，因此积分值为：

$$C'(l, s) = \frac{2}{l} \left\{ \operatorname{Re} \left[\sqrt{1 - \left[\frac{|s|}{l} + \frac{l}{2} \right]^2} \right] - \operatorname{Re} \left[\sqrt{\epsilon^2 - \left[\frac{|s|}{l} - \frac{l}{2} \right]^2} \right] \right\} \quad (21)$$

l 方向上的截止频率为 2, s 方向上的截止频率为 0.5。将(21)式代入(11)式可得环瞳系统的三维光学传递函数表达式:

$$C(l, s) = \iiint_{l_1 l_2} \frac{4}{l_1 l_2} \left\{ \operatorname{Re} \left[\sqrt{1 - \left[\frac{|s' - 0.5s|}{l_1} + \frac{l_1}{2} \right]^2} \right] - \operatorname{Re} \left[\sqrt{\epsilon^2 - \left[\frac{|s' - 0.5s|}{l_1} - \frac{l_1}{2} \right]^2} \right] \right\} \\ \times \left\{ \operatorname{Re} \left[\sqrt{1 - \left[\frac{|s' + 0.5s|}{l_2} + \frac{l_2}{2} \right]^2} \right] - \operatorname{Re} \left[\sqrt{\epsilon^2 - \left[\frac{|s' + 0.5s|}{l_2} - \frac{l_2}{2} \right]^2} \right] \right\} dx dy ds' \quad (22)$$

由傅里叶光学可得焦面上的点物发出的荧光光强为:

$$I(u) = \int_{-\infty}^{\infty} C(0, s) \exp(isu) ds \quad (23)$$

3 数值计算

用不同的探测器及透镜形式将得到不同的分辨率, 对(7)式、(8)式进行数值计算, 若圆形探测器半径 $V_d = 6.0$ 个光学单位(光学坐标单位), 同点源点探测器进行比较, 可得图 3 所示的纵向光学特性, 可知圆形探测器系统分辨率低于点探测系统。

当采用不同 ϵ 值的环形透镜对式(11)、(12)进行数值计算, 可得图 4 所示的曲线, 分析图中的纵向光强响应曲线, 可明显看出采用 $\epsilon = 0.25$ 或 $\epsilon = 0.50$, 的实际系统的纵向分辨率较高。由计算表明, 如果对旁瓣进行抑制, 环形透镜的使用可提高系统的横向分辨率和系统的纵向分辨率。从而得出采用环形透镜比点探测器可获得更高的分辨率的结论。

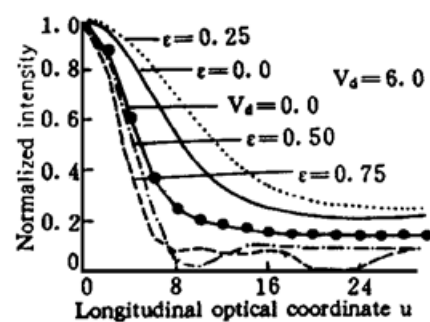
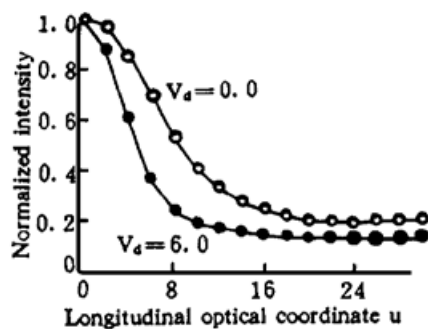


Fig. 3 Longitudinal optical properties with limited detectors Fig. 4 Longitudinal optical properties with different inner-outer aperture ratio

在实际系统中, 为提高探测的荧光的强度, 需增大探测器的尺寸, 因此如何合适地选择环形透镜的 ϵ 和探测器大小是三维超分辨率成像的关键之一, 其中 l 方向上的截止频率为 2, s 方向上的截止频率为 0.5, 对(22)式进行数值计算, 可得图 5 所示的三维光学传递函数曲线图。面探测器归一化三维 - 光学传递函数若在 $s = 0$ 及 $l = 0$ 的截面计算可得二维的光学传递函数。

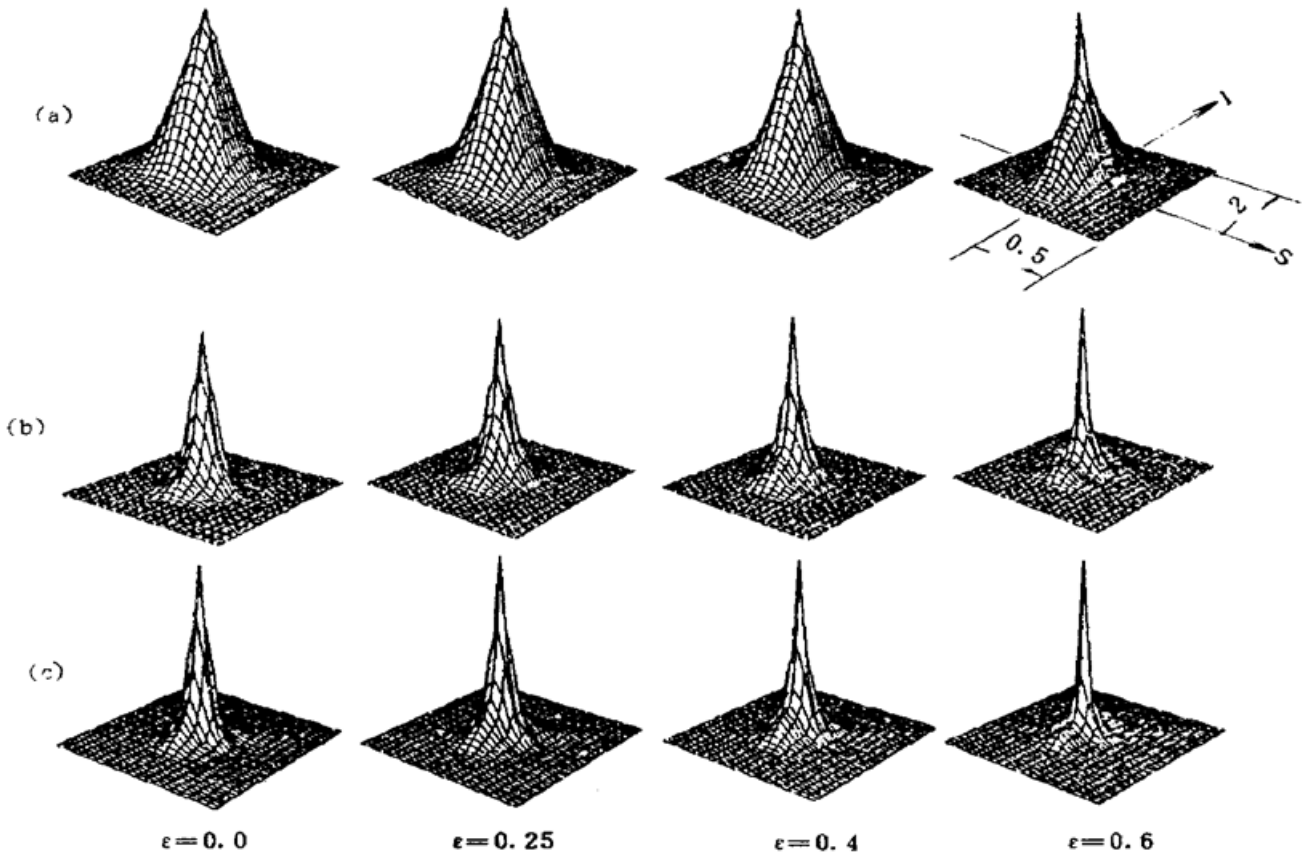


Fig. 5 The normalized 3D OTF of fluorescent confocal scanning microscope

(a) point detector, (b) the detector $V_d = 6.0$, (c) the detector $V_d = 8.0$

4 结果讨论

从上述分析及曲线可得出: 在共焦系统中采用环形透镜不仅可提高系统的横向分辨率, 并且可提高系统的纵向分辨率。实际应用中, 在采用有限大小探测器的共焦系统中, 计算系统的传函及光强响应函数, 可获得系统的最佳匹配, 实现超分辨率成像。从共焦扫描系统三维传递函数的三组曲线以及有限大小探测器的纵向光学特性曲线可以看出:

1) 点探测器具有最佳的传递函数, 当探测器的直径增大时传函明显下降。

2) 当采用有同一探测器时, 随着环形透镜的内外径比的增大, 传递函数下降。 $\epsilon = 0$, 是环形透镜的特例。

3) 在点探测情况下, 环形透镜的内外径比 $\epsilon \geq 0.5$ 时, 三维光学传递函数曲线出现空间频率的失锥(missing cone), $\epsilon = 0.6$ 时已相当明显, 当探测器的尺寸 $V_d \geq 6$ 光学单位时, 即使 $\epsilon = 0$ 时, 空间频率的失锥就已经出现, 并随 ϵ 的增加而越来越大。

4) 当 $V_d = 6.0$ 光学单位时, 光强半宽度(见图 3) 几乎已是理想点探测系统 $V_d = 0.0$ 光学单位时的两倍, 也就是说分辨本领降低了一倍。

5) 采用环瞳的优化共焦系统中, 也必须使用有限尺寸的圆形探测器, 由图 4 看出, $V_d = 6.0$ 时, 当 ϵ 分别为 $\epsilon = 0.0$, $\epsilon = 0.75$ 时, 纵向光学特性均比 $V_d = 0.0$ 时的理想系统光强半宽度要宽得多, 即分辨率下降。而在 $V_d = 6.0$ 时, $\epsilon = 0.25$ 和 $\epsilon = 0.50$ 时, 则纵向光强响应不但比 $\epsilon = 0.0$, $\epsilon = 0.75$ 时窄得多, 甚至比 $V_d = 0.0$ 时的理想系统还要窄, 即分辨率还要高, 因此采用环瞳的共焦系统, 经优化设计可以获得比理想系统 $V_d = 0.0$ 的点探测系统更高的

纵向分辨率。

参 考 文 献

- [1] Min Gu, C. J. R. Sheppard, Three-dimensional imaging in confocal fluorescent microscopy with annular lens. *J. Modern Optics*, 1991, **38**(11) : 2247~ 2263

Imaging Optimization of Fluorescence Confocal Scanning System

Zhang Ping Wu Zhen Wang Cuiying Xian Jiying

(*Department of Optoelectronic Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074*)

(Received 9 February 1996; revised 6 May 1996)

Abstract The mathematical model of 3-dimensional optical transfer function (OTF) is obtained by Fourier transform of point spread function for a fluorescence confocal scanning microscopic system. From this, the 3-dimensional OTF is computed for different sized annular lenses and detectors. By using computer simulation and numerical computation of OTF, the image property is analyzed for the case of different annular lenses and detector in confocal scanning system.

Key words fluorescence, 3-dimensional image, confocal scanning, transfer function.