

利用共焦扫描显微术和变迹术相结合 实现光学超分辨*

丁志华¹ 王桂英² 包正康¹

- 1, 浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 杭州 310027
2, 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800

摘 要 运用适当形式的光瞳滤波器(变迹术)可以改变成像系统点振幅响应的分布,使其具有类似于冲击函数(Dirac-delta 函数)的形式,这样就有可能实现光学超分辨,但变迹术的运用往往会因其强烈的旁瓣效应而导致成像系统对比度的急剧下降。本文提出的共焦型超分辨方案则能有效地抑制上述旁瓣。此外,本文还进一步提出了实现三维光学超分辨的理论框架。

关键词 光学超分辨, 变迹术, 共焦扫描显微术。

1 引 言

所谓变迹术就是确定光瞳函数的适当形式,以实现光学系统最佳的成像效果。这方面的工作很多^[1-3],值得一提的是 Frieden^[2,3]的工作,他提出的光瞳滤波器具有特殊的孔径拓展功能,但由于该滤波器已将入射能量强烈地衍射到主瓣之外的旁瓣上,尤其是视场边缘的旁瓣值仍高达主瓣峰值的~20%^[2],由此造成的强烈背景噪音使得图像对比度急剧下降。因此,这样的变迹术如果单独运用,则会因对比度太低而无法真正实现光学超分辨。如果能设法将主瓣之外的衍射能量加以抑制的话,则将是很有意义的。本文提出的共焦型超分辨装置,运用两个点振幅响应函数的乘积作用,有效地抑制了旁瓣,从而解决了低对比度的问题。文中还进一步分析了获取三维光学超分辨的可能性^[4]。需要特别指出,在共焦装置中,可以采用样品扫描的成像方式,这样就避免了非轴上点的非高斯像面点成像质量下降的问题,严格保证了光学系统成像必须的三维空间不变性。

2 理论分析

为讨论方便,考虑一维成像系统。

参见图 1,一光瞳滤波器置于物镜的后焦面上,其振幅透过系数 $U_N(\beta)$ 设计为以下形式

$$U_N(\beta) = (x_0/2\pi\beta_1)^{1/2} \sum_{n(\text{even})=0}^N (-1)^{n/2} \lambda_n(c_1)^{-3/2} \psi_n(c_1, 0) \psi_n(c_1, \beta x_0/\beta_1) \quad (1)$$

* 本文得到中国博士后科学基金和浙江大学现代光学仪器国家重点实验室开放课题(LM01-9700)资助。

式中 $\beta = 2\pi x/\lambda f$, x 为物镜面上的空间坐标, f 为物镜焦距, λ 为成像光波长。 Ψ_n 和 λ_n 分别为 n 阶扁长球函数及其相应的本征值。 $c_1 = \beta_1 x_0$ 为一维成像系统的空间带宽积^[2], 而 β_1 决定物镜的口径大小, x_0 决定视场大小。

假定该滤波器被振幅为 A 的均匀单色光照明, 则在滤波器后的光场分布应为

$$E_t(\beta) = A U_N(\beta) \quad (2)$$

在物镜前焦面上的振幅分布, 即等效物镜(物镜与滤波器的组合)的点振幅响应函数为

$$a_N(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} E_t(\beta) P(\beta) \exp(i\beta x) d\beta = A \int_{-\beta_1}^{+\beta_1} U_N(\beta) \exp(i\beta x) d\beta \quad (3)$$

式中 $P(\beta) = \begin{cases} 1, & |\beta| \leq \beta_1 \\ 0, & \text{其它} \end{cases}$ 代表透明物镜的光瞳函数。

将(1)式代入(3)式则有

$$a_N(x) = A \sum_{n(\text{even})=0}^N \lambda_n(c_1)^{-1} \Psi_n(c_1, 0) \Psi_n(c_1, x) \quad (4)$$

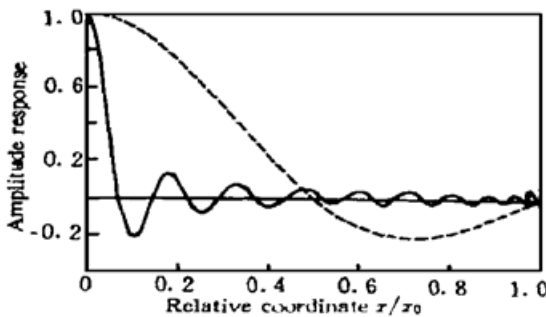


Fig. 2 Point amplitude response curves. Solid line is the normalized point amplitude response of the modified lens with an apodization film, and dot line is its asymptotic sinc functions, dash line is the point amplitude response of the lens with a clear aperture

振幅响应特性在有限区域内得到了优化。但滤波器的使用也导致了两个基本问题需要解决, 1) 增强了的点振幅响应函数的旁瓣所导致的成像对比度下降; 2) 上述点振幅响应特性只适用于轴上点, 或者说成像系统不严格具备空间不变性。显而易见, (4) 式只适用于轴上点, 对于轴外点, 如 $x = \Delta$, 则(4)式应修正为

$$a_N(x - \Delta) = A \sum_{n(\text{even})=0}^N \lambda_n(c_1)^{-1} \Psi_n(c_1, \Delta) \Psi_n(c_1, x) \quad (7)$$

因此, 对于轴外点来说, 滤波器形式必须加以改变, 才能具有和轴上点一样的成像质量。为此, 本文提出了图 1 所示的实验装置。在该装置中利用另一普通物镜和上述等效物镜共同

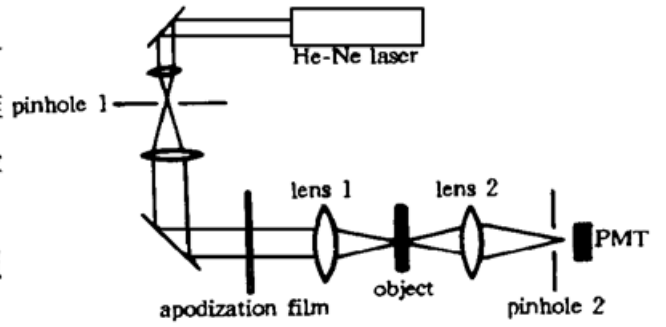


Fig. 1 Suggested experimental setup for achieving lateral optical superresolution. An apodization film is inserted at the back focal plane of lens 1, and lens 2 is added to form an confocal configuration so as to suppress the great sidelobes caused by the apodization film

上式的右边恰好是 Dirac-delta 函数在区域 $|x| \leq x_0$ 内的完备正交函数系的前 N 项^[2, 3]。参见图 2 所示的归一化响应曲线 $a_N(x)/a_N(0)$, 由图可见, 当 N 增大时, $a_N(x)$ 具有渐进形式, 即

$$a_N(x) \rightarrow \text{sinc}(\pi\beta'_1 x), \quad |x| \leq x_0 \quad (5)$$

式中 $\text{sinc}(x) \equiv \sin(x)/x$, $\beta'_1 = \beta_1/\delta_N$, $\delta_N = 3\beta_1 x_0/N\pi$ 。

由(5)式显见, 等效物镜点振幅响应函数的主瓣中心宽度可近似为

$$\Delta_N = 6x_0/N \quad (6)$$

至此可以得出结论: 如果成像区域是有限的, 就可以通过插入光瞳滤波器的方法(变迹术), 将等效物镜的横向分辨率任意程度地提高, 准确地说, 成像系统的点

组成一共焦显微镜, 这样的共焦构置可以有效地抑制旁瓣。而且, 如果采用样品扫描的成像方式, 就能保证系统始终是轴上点成像, 从而避免了成像特性的空间不一致性。

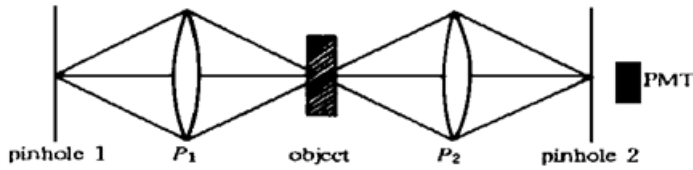


Fig. 3 Confocal setup with point-source and point-detector based on Fig. 1. P_1 represent the combination of lens 1 and its apodization film with effective point amplitude response of h_1 , P_2 is lens 2 with point amplitude response h_2

为了更清楚地表达实验装置的共焦特性, 将图 1 画成如图 3 所示的等效形式。在图 3 中, P_1 代表上述等效物镜(物镜和滤波器的组合), 其点振幅响应函数设为

$$h_1(x) = a_N(x) \quad (8)$$

P_2 为另一普通物镜, 其点振幅响应函数设为

$$h_2(x) = \text{sinc}(\pi\beta_2 x) \quad (9)$$

式中 β_2 的定义类似于 β_1 , 它与普通物镜的口径有关。

假定探测器空间和物空间的坐标分别为 x' 和 x 。由于是点光源照明, 所以到达物面上的波场, 即 P_1 的点振幅响应函数可表示为

$$U_1(x) = h_1(x) \quad (10)$$

则物体之后的波场为

$$U_2(x) = h_1(x) O(x - x_s) \quad (11)$$

式中 $O(x)$ 代表物体的透射函数, x_s 为扫描点。假定成像物体为有限大小, 即

$$O(x) = 0, \quad |x| > x_0/2 \quad (12)$$

则有以下关系

$$|x_s| \leq x_0/2, \quad O(x - x_s) = 0, \quad |x - x_s| > x_0/2 \quad (13)$$

由(13)式可知

$$O(x - x_s) = 0, \quad |x| > x_0 \quad (14)$$

因此, 由(5)式、(7)式、(11)式和(14)式得

$$U_2(x) = \begin{cases} a_N(x) O(x - x_s) & |x| \leq x_0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (15)$$

所以在探测器空间有

$$U_3(x') = U_2 \otimes h_2 = \int_{-\infty}^{+\infty} U_2(x) h_2(x - x') dx \quad (16)$$

式中符号 \otimes 代表卷积运算。探测器接收到的光强信号为

$$I(x_s) = \int_{-\infty}^{+\infty} |U_3(x')|^2 D dx' \quad (17)$$

式中 D 为探测器的响应函数, 可假定点探测器的响应为理想的 Dirac-delta 函数, 即

$$D = \delta(x) \quad (18)$$

则由(6)式、(15)式、(16)式、(17)式和(18)式可以推出

$$I(x_s) = |h_{\text{eff}} \otimes O(x)|^2 \quad (19)$$

其中

$$h_{\text{eff}}(x) = h_1(x) h_2(x) \quad (20)$$

它为从物空间到像空间的有效点振幅响应函数。

将(3)式、(5)式和(6)式代入(20)式可得

$$h_{\text{eff}}(x) = \begin{cases} \text{sinc}(\pi\beta_1/\delta_N x) \text{sinc}(\pi\beta_2 x) & |x| \leq x_0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (21)$$

(21)式表明: 1) 通过上述的变迹术, 可将有效点振幅响应函数的主瓣宽度任意程度地缩小, 其具体宽度由(4)式决定; 2) 样品的有限大小 ($|x| \leq x_0/2$) 保证了有效点振幅响应函数只对限定区间 $|x| \leq x_0$ 有贡献; 3) 两个 sinc 函数的乘积能使成像系统的有效点振幅响应函数的旁瓣得到极大的抑制, 这是共焦显微术的一大特点(参见图 4)。因此, 利用变迹术和共焦术相结合就能保证高对比度的超分辨成像。

应该指出, 图 1 所示的成像系统属于间接成像系统, 因此可以利用光电倍增管来对微弱信号进行探测, 然后输入计算机作进一步的图像处理和图像重建。

上述结果还可简单地推广到二维情形。

假定滤波器的透射函数为

$$U_{N, N'}(\beta, \gamma) = U_N(\beta) U_{N'}(\gamma) \quad (22)$$

按照完全类似的推导可得点振幅响应函数为

$$a_{N, N'}(x, y) = A \left[\sum_{n(\text{even})=0}^N \lambda_n(c_1)^{-1} \psi_n(c_1, 0) \psi_n(c_1, x) \right] \left[\sum_{n(\text{even})=0}^N \lambda_n(c_2)^{-1} \psi_n(c_2, 0) \psi_n(c_2, y) \right] \quad (23)$$

式中 $c_1 = \beta_1 x_0$, $c_2 = \gamma_1 y_0$, (β_1, γ_1) 决定方形透镜的口径, (x_0, y_0) 决定视场的大小。

当 N 和 N' 增大时, (23)式也具有渐进形式

$$a_{N, N'}(x, y) \rightarrow \text{sinc}(\pi\beta'_1 x) \text{sinc}(\pi\gamma'_1 y), \quad |x| \leq x_0, |y| \leq y_0 \quad (24)$$

式中 $\beta'_1 = \beta_1/\delta_N$, $\gamma'_1 = \gamma_1/\delta_{N'}$, $\delta_N = 3\beta_1 x_0/N\pi$, $\delta_{N'} = 3\gamma_1 y_0/N'\pi$ 。

3 三维光学超分辨的实现

光学层切性质是共焦技术的最大优点^[5, 6], 因此对于共焦系统来说, 提高轴向分辨率显得尤为重要。

成像系统的轴向性质同样可以通过类似的变迹术来加以改善。图 5 是实现三维超分辨的光学原理图, 它与图 1 的不同之处是物镜 2 的后焦面上设置了另一光瞳滤波器 $W_M(\beta)$ 和另一透镜。假定 $W_M(\beta)$ 的振幅透过系数具有以下形式

$$W_M(\beta) = |\beta| \sum_{n(\text{even})=0}^M (-1)^{n/2} \lambda_n(c')^{-3/2} \psi_n(c', 0) \psi_n[c', z_0(1 - 2\beta^2/\beta_2^2)] \quad (25)$$

式中 $c' = \beta_2^2 z_0/4k$, 它与焦深有关^[3], z_0 为成像物体的厚度, β_2 决定物镜 2 的口径。

依照上节类似的推导, 就可得到物镜 2 经变迹后的点振幅响应函数为

$$b_M(z) = \int_{-\beta_2}^{+\beta_2} W_M(\beta) \exp[j(z/2k)\beta^2] d\beta \quad (26)$$

将(25)式代入(26)式有

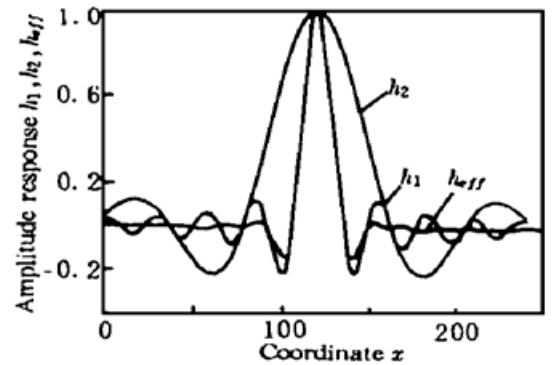


Fig. 4 Effective point amplitude of the confocal setup. Sidelobes is greatly suppressed by the multiplication of sinc-function, which is the characteristic of confocal setup

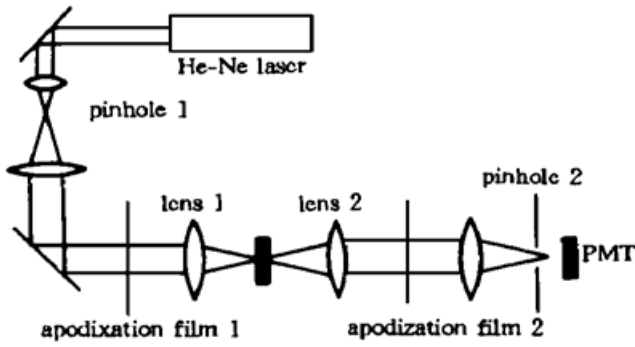


Fig. 5 Suggested configuration for achieving three-dimensional optical superresolution, where the combination of two lenses and another apodization film has taken the place of lens 2 in the setup shown in Fig. 1

式

$$b_M(z) \rightarrow \text{sinc}(\pi\beta'_2 z), \quad |z| \leq z_0 \quad (29)$$

式中 $\beta'_2 = \beta_2/\delta_M$, $\delta_M = 3\beta_2 z_0/M\pi$. 由此可得轴向主瓣中心宽度为

$$\Delta_M = 6z_0/M \quad (30)$$

(30) 式表明: 如果将点振幅响应函数在轴向的主瓣中心宽度看作焦深的话, 则只要 M 足够大, 就可通过变迹术获得任意窄的焦深, 从而实现轴向超分辨。

假定图 5 中的样品是三维受限的, 即 $O(x, y, z) = 0$, 如果 $|x| > x_0/2$ 或 $|y| > y_0/2$ 或 $|z| > z_0/2$. 则图 5 所示系统从物空间到像空间的有效点振幅响应函数应为

$$h_{\text{eff}}(x, y, z) = h_1(x, y) h_2(z) \quad (31)$$

$$h_1(x, y) = \begin{cases} a_{N, N'}(x, y) & |x| \leq x_0, |y| \leq y_0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (32)$$

$$h_2(z) = \begin{cases} b_M(z) & |z| \leq z_0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (33)$$

由(23)式、(24)式、(29)式、(31)式、(32)式和(33)式可推出

$$h_{\text{eff}}(x, y, z) = \begin{cases} \text{sinc}(\pi\beta_1/\delta_N x) \text{sinc}(\pi\beta_1/\delta_N y) \text{sinc}(\pi\beta_2/\delta_M z), & |x| \leq x_0, |y| \leq y_0, |z| \leq z_0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (34)$$

(34) 式表明: 图 5 所示的共焦成像系统不仅可以实现横向超分辨, 焦深也能有效地压缩, 因而其光学层切性质可以得到极大地改善, 是一种三维超分辨系统。此外, 由于三个 sinc 函数的乘积作用, 有效地抑制了点振幅响应函数的旁瓣, 因而成像系统同时具有高对比度的特点。

结 论 运用适当形式的光瞳滤波器(变迹术)可以改变显微物镜远场衍射场的三维分布, 使其点振幅响应函数具有类似于 Delta 函数的形式, 这样就有可能提高成像系统的横向或(和)纵向分辨率。不过该技术存在着对比度急剧下降和成像性质空间不一致性的缺陷。

变迹术所导致的对比度下降和成像性质空间不一致问题, 可以通过样品扫描方式的共焦构置加以解决。

如果利用光瞳滤波器改善第一物镜的横向成像性质, 而利用另一光瞳滤波器改善第二物

$$b_M(z) = A \sum_{n(\text{even})=0}^M \lambda_n(c')^{-1} \psi_n(c', 0) \psi_n(c', z) \quad (27)$$

显而易见, 上式右边是 Dirac-delta 函数在区域 $|z| \leq z_0$ 内的完备正交函数系的前 M 项。应该指出, (27) 式也仅适用于高斯像面点, 而对于离轴点, 如 $z = \Delta$, 则应修正为

$$b_M(z - \Delta) = A \sum_{n(\text{even})=0}^M \lambda_n(c')^{-1} \psi_n(c', \Delta) \psi_n(c', z) \quad (28)$$

由于在共焦成像系统中, 可采用样品扫描的成像方式, 因而也就不存在对光瞳滤波函数进行修正的必要。当 M 增大时, $b_M(z)$ 也具有渐进形

镜的轴向成像性质, 这样的两个物镜通过共焦方式加以运用, 则可形成三维光学超分辨系统。

参 考 文 献

- [1] M. Born, E. Wolf, Elements of the theory of diffraction. Chap. 8 in *Principles of optics*, Oxford, Pergamon press, 1975 : 370~ 458
- [2] B. R. Frieden, On arbitrarily perfect imagery with a finite aperture. *Opt. Acta*, 1969, **16**(6) : 795~ 807
- [3] B. R. Frieden, The extrapolating pupil, image synthesis, and some thought applications. *Appl. Opt.*, 1970, **9**(11) : 2489~ 2496
- [4] Z. Ding, G. Wang, M. Gu *et al.*, Superresolution with an apodization film in a confocal setup. *Appl. Opt.*, 1997, **36**(1) : 360~ 363
- [5] C. J. R. Sheppard, Scanning optical microscopy. in *Advances in optical and electron microscopy*, R. Barer, V. E. Cosslett eds. London, Academic Press, 1987, **10** : 1~ 98
- [6] T. Wilson, *Confocal Microscopy*, London, Academic Press, 1990 :

Optical Superresolution through the Combination of Confocal Scanning Microscopy and Apodization

Ding Zhihua¹ Wang Guiying² Bao Zhengkang¹

1, State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation Zhejiang University, Hangzhou 310027
2, Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800

(Received 16 January 1997)

Abstract The application of an appropriate apodization film to an ordinary lens makes the point amplitude response asymptotic to a Dirac-delta function, or causes an arbitrarily narrow depth of focus. This implicates that we may achieve lateral or axial superresolution through implementing an apodization film. However, the large sidelobes spreading all through the field, which are produced by imposing an apodization film onto an ordinary lens, may result in a noisy background degrading the image contrast. In this paper, we put forward a scheme of implementing a confocal setup to suppress the large sidelobes. Furthermore, a configuration for achieving three-dimensional superresolution is depicted and discussed.

Key words optical superresolution, apodization, confocal scanning microscopy.