

偏振共焦扫描激光显微镜的成像特性研究*

唐志列 梁瑞生 朱小松 何振江 司徒达
(华南师范大学物理系, 广州 510631)

摘 要 讨论了共焦扫描激光显微镜的纵向分辨率和信噪比对三维成像能力的影响, 给出了纵向分辨率极限的判据, 提出了旨在提高信噪比进而获取强表面反射或弱散射物体以及偏振物体的显微结构图像的偏振共焦扫描激光显微镜。

关键词 偏振, 共焦显微镜, 纵向分辨率。

1 引 言

由于共焦扫描激光显微镜具有独特的纵向分辨能力和较高的横向分辨率, 因此在生物组织的超分辨率三维成像和半导体器件检测等领域具有重要意义, 近十多年来进行了广泛和深入的研究^[1-8]。影响共焦扫描激光显微镜成像特性的两个关键因素是分辨率和信噪比, 对层析成像或三维成像来说, 共焦扫描显微镜的纵向分辨率显然是一个重要因素, 目前仅有少数文献讨论过其分辨率极限和判据。本文从衍射效应的二次方相位因子出发, 讨论了焦深的形成及其对纵向分辨率的影响, 并得出了纵向分辨率极限的判据。影响共焦扫描激光显微镜三维成像能力的另一个重要因素是信噪比, 对弱散射物体或强表面反射物体进行层析或三维成像时, 物体的表面反射成为影响信噪比的主要因素。如何消除表面反射的影响是决定能否获得弱散射物体层析图像的关键因素, 本文提出的偏振共焦扫描激光显微镜可以有效消除表面反射光的影响, 同时可以获取不同偏振状态下物体的显微图像, 进而可望获取有关结构的次辐射源、染色质、发色团的取向排列以及物质的旋性短程和长程序结构, 因此, 偏振共焦扫描显微镜具有许多独特的优点和很好的应用前景。

2 共焦扫描激光显微镜的纵向分辨率极限及其判据

从衍射效应的二次方相位因子出发, 分析共焦扫描激光显微镜纵向分辨率、分辨率极限以及影响分辨率的因素。由衍射效应引起的二次方相位因子为:

$$\Delta\phi = \exp [ik(x^2 + y^2)/2z] \quad (1)$$

显微镜的三维光瞳函数可写为:

$$T(x, y, z) = p(x, y) \exp [jk(x^2 + y^2)/2z] \quad (2)$$

* 国家自然科学基金和广东省“九·五”攻关项目。

收稿日期: 1998-03-30; 收到修改稿日期: 1998-05-25

式中

$$p(x, y) = \begin{cases} 1, & x^2 + y^2 \leq R^2 \\ 0, & \text{其他} \end{cases} \quad (3)$$

为二维光瞳函数, R 为光瞳半径, 为了计算方便, 引入归一化直角坐标、光学坐标和归一化空间频率:

$$\xi = \frac{x}{R}, \quad \eta = \frac{y}{R}; \quad (4)$$

$$u_x = \frac{2\pi}{\lambda} x \sin \alpha, \quad u_y = \frac{2\pi}{\lambda} y \sin \alpha, \quad u_z = \frac{2\pi}{\lambda} z \sin^2 \alpha, \quad (5)$$

$$s = \frac{\lambda}{\sin \alpha} f_x, \quad t = \frac{\lambda}{\sin \alpha} f_y, \quad w = \frac{\lambda}{\sin^2 \alpha} f_z, \quad (6)$$

那么(2)式可以改写为:

$$T(\xi, \eta, u) = p(\xi, \eta) \exp [iu(\xi^2 + \eta^2)/2] \quad (7)$$

根据傅里叶光学知识知, 显微镜的三维光学传递函数为:

$$H(s, t; w) = \iiint p(s', t'; u) T^*(s - s', t - t'; u) \exp(-iwu) ds' dt' du \quad (8)$$

把(7)式代入(8)式得:

$$\begin{aligned} H(s, t; w) &= \iint p(s' + \frac{s}{2}, t' + \frac{t}{2}) p^*(s' - \frac{s}{2}, t' - \frac{t}{2}) \exp[ju(s's + t't - w)] ds' dt' du = \\ &= \iint p(s' + \frac{s}{2}, t' + \frac{t}{2}) p^*(s' - \frac{s}{2}, t' - \frac{t}{2}) \delta(s's + t't - w) ds' dt' = \\ &= \frac{1}{|s|} \int_{-\infty}^{\infty} p(\frac{w - t't}{s} + \frac{s}{2}, t' + \frac{t}{2}) p^*(\frac{w - t't}{s} - \frac{s}{2}, t' - \frac{t}{2}) dt' \end{aligned} \quad (9)$$

因此,

$$\begin{aligned} H(s, 0; w) &= \frac{1}{|s|} \int_{-\infty}^{\infty} p(\frac{w}{s} + \frac{s}{2}, t') p^*(\frac{w}{s} - \frac{s}{2}, t') dt' = \\ &= \frac{1}{|s|} [1 - (|\frac{w}{s}| + \frac{s}{2})^2]^{1/2} \end{aligned} \quad (10)$$

考虑到光学系统的圆对称性, 有:

$$H(s, t; w) = H(\sqrt{s^2 + t^2}, 0; w) = \begin{cases} (1/\rho)[1 - (|w|/\rho + \rho/2)^2]^{1/2}; & \rho < 2, \text{ 且 } |w| < \rho - \rho^2/2; \\ 0; & \text{其它} \end{cases} \quad (11)$$

式中 $\rho = \sqrt{s^2 + t^2}$,

由(11)式可知, 纵向截止频率与横向截止频率满足:

$$|w| = \rho - \frac{\rho^2}{2} = -\frac{1}{2}(\rho - 1)^2 + \frac{1}{2} \leq \frac{1}{2} \quad (12)$$

把(6)式代入(12)式得:

$$f_{z\text{截止}} = \frac{\sin^2 \alpha}{2\lambda} \quad (13)$$

根据测不准关系:

$$\Delta z \Delta f_z = \Delta z f_{z\text{截止}} \approx 1 \quad (14)$$

则

$$\Delta z \approx \frac{2\lambda}{\sin^2 \alpha} \quad (15)$$

显然, (15) 式就是显微镜的焦深, 即由衍射效应引起的纵向坐标测不准量与焦深是同一个量, 也就是说: 焦深与纵向通频带是一对共轭量, 正如横向分辨率极限(即瑞利判据)与横向通频带是一对共轭量一样, 焦深越大, 纵向通频带越小, 因而纵向分辨率越差。据此, 可以将 (15) 式作为纵向分辨率的判据。

把爱里斑直径公式

$$d = \frac{1.22\lambda}{n \sin \alpha} \quad (16)$$

代入(15)式得:

$$\Delta z = \frac{n}{\lambda} d^2 \quad (17)$$

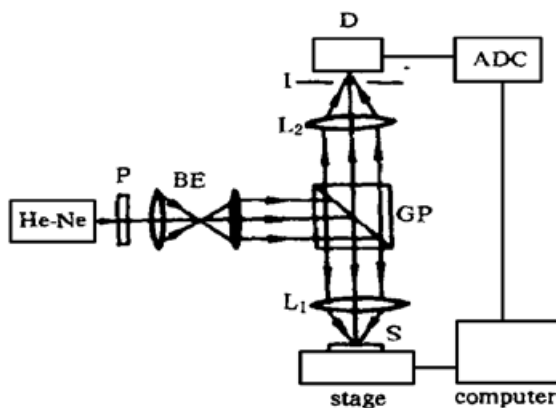
(17) 式表明, 纵向分辨率极限与爱里斑直径的平方成正比, 而显微镜的横向分辨率极限与爱里斑直径的一次方成正比。由此可见, 衍射效应对纵向分辨率的影响比横向分辨率的影响要大得多, 这也正是显微镜的横向分辨率比纵向分辨率好得多的原因。另一方面, (17) 式也清楚表明, 如果改善横向分辨率, 可以极大地改善纵向分辨率, 采用点源点探测器的共焦显微镜, 横向分辨率可以提高 2~ 4 倍, 而纵向分辨率则可以提高 4~ 16 倍, 因而很有利于作光学层析。这也是共焦显微镜具有独特的纵向分辨率的原因所在。

3 表面反射光对成像的影响

利用共焦扫描显微技术对生物组织进行层析, 主要是收集物体的散射光或荧光进行成像, 对于实际的共焦扫描显微镜, 为了获得足够的光通量以保证有足够的探测灵敏度, 总是采用有一定大小的探测器针孔, 但针孔增大的同时, 表面反射光及离焦物点的散射光同时进入探测器, 使得信噪比下降。对于强表面反射物体或弱散射物体, 表面反射光有时是具有决定性的影响。实验研究表明, 这一分析是正确的。

4 偏振共焦扫描激光显微镜系统

偏振共焦扫描激光显微系统结构如图1所示, He-Ne激光经起偏器P后成为线偏振光,



经扩束器 BE 扩束后进入格兰棱镜 GP, 由格兰棱镜 GP 反射的光(满足布儒斯特角条件)进入物镜 L_1 聚焦到样品 S 上, 由样品反射和散射的光被物镜收集再进入格兰棱镜, 因为反射光满足布儒斯特角条件而被格兰棱镜反射回原光路, 只有散射光可以通过格兰棱镜被透镜 L_2 聚焦到孔 I 上。改变光路中的 $\lambda/2$ 波片, 可以获得不同偏振态的散射光。样品平台的驱动扫描以及数据采集和图像重建均由计算机完成。

Fig. 1 The diagram of polarized confocal scanning microscopy

5 实验结果分析讨论

用所建立的偏振共焦扫描激光显微镜对多种集成电路和生物样品进行了实验,图2是采用非偏振检测方法(即将图1中的格兰棱镜换成普通的分束板)获得的一种集成电路的显微图像。图3是采用偏振检测方法获得的同一种集成电路的不同区域的显微图像;图2、图3表明,对于这种集成电路,采用偏振和非偏振检测方法均可以获得显微图像,只是图像质量有所区别。

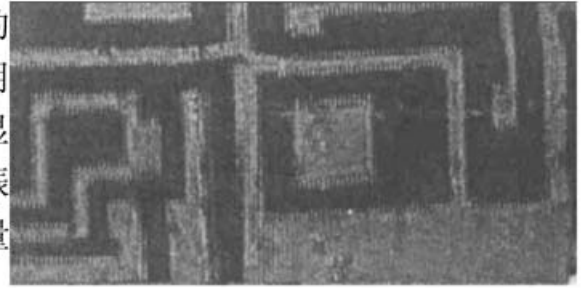


Fig. 2 Image of IC with non-polarization

图4是采用偏振检测方法获得的另一种大规模集成电路的显微图像,对这种大规模集成电路,因为表面反射很强,用非偏振检测方法根本无法获得显微图像,除了在显示屏上出现一白色方块外,无法获得其显微结构,此外,利用美国进口的MRC600型共焦扫描激光显微镜对这种大规模集成块进行的实验,也得到类似的结构,即在显示屏上出现一白色方块,没能观察到集成电路的显微结构,但由于该型显微镜没有偏振检测装置,因此没能在该显微镜上获得大规模集成电路的显微图像进行比较。



Fig. 3 Image of IC with polarization



Fig. 4 Image of IC with polarization

总 结 1) 共焦显微镜的纵向分辨率主要由衍射效应的二次方相位分布以及焦深决定,其分辨率极限是一个焦深,焦深越大,纵向通频带越窄,纵向分辨能力越差。

2) 采用偏振共焦扫描显微镜可以有效消除表面反射的影响,提高信噪比,从而可获得强表面反射或弱散射物体的显微图像以及获取不同偏振状态下物体的显微图像。

参 考 文 献

- [1] Amos W B, White J G, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl. Opt.*, 1987, **26**(16): 3239~ 3243
- [2] Suzuki T, Horikawa Y. Development of a real-time scanning laser microscope for biological use. *Appl. Opt.*, 1986, **25**(22): 4115~ 4121
- [3] Sheppard C J R, Mao X Q. Three-dimensional imaging in a microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1989, **6**(9): 1260~ 1269
- [4] Sheppard C J R, Gu M, Mao X Q. Three-dimensional coherent transfer function in a reflection-mode confocal scanning microscope. *Optics Commu.*, 1991, **81**(5): 281~ 284
- [5] Gan X, Gu M, Sheppard C T R. Fluorescent image formation in the fibre-optical confocal scanning microscope. *J. Mod. Optics*, 1992, **39**(4): 825~ 834
- [6] Gu M, Sheppard C J R. Three-dimensional image formation in confocal microscopy under ultra-short-laser-pulse illumination. *J. Mod. Optics*, 1995, **42**(4): 747~ 762
- [7] Kimura S, Munakata C. Dependence of 3-D optical transfer functions on the pinhole radius in a fluores-

cent confocal optical microscope. *Appl. Opt.*, 1990, **29**(20) : 3007~ 3011

[8] Drazic V. Three-dimensional transfer function of coherent confocal microscopes with extended source and detector. *J. Mod. Optics*, 1992, **39**(8) : 1777~ 1790

Image Property of Polarized Confocal Scanning Microscopy

Tang Zhilie Liang Ruisheng Zhu Xiaoshong He Zhenjiang Situ Da

(*Department of Physics, South China Normal University, GuangZhou 510631*)

(Received 30 March 1998; revised 25 May 1998)

Abstract The influence of vertical resolution and signal-noise-ratio (SNR) of confocal scanning microscopy (CSM) on three-dimension (3D) imaging ability is analyzed. The criterion for vertical resolution of CSM is given. A polarized CSM is designed to improve the SNR so as to obtain the microstructure of weak scattering object or strong surface reflection object or polarized object.

Key words polarization, confocal microscopy, vertical resolution.